

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 VIII.**

Rigorózní práce

Hradec Králové, leden 2006

Jana Nožičková

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu GA UK číslo 124/2005/B-BIO/FaF.

Ráda bych touto cestou poděkovala Doc. Lubomíru Opletalovi, CSc. za odborné vedení, poskytnutí cenných rad a všestrannou pomoc při vypracování této diplomové práce. Dále bych poděkovala PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. za poskytnutí informací. Také děkuji všem ostatním pracovníkům katedry, kteří mi s prací pomohli.

Obsah

| | |
|---|----|
| I. ÚVOD | 6 |
| II. CÍL PRÁCE | 8 |
| III. TEORETICKÁ ČÁST | 9 |
| 1. SYSTEMATICKÉ ZAŘAZENÍ A CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH TAXONŮ | |
| 1.1 Čeleď Agaricaceae (Pečárkovité) | 10 |
| 1.1.1 Rod <i>Agaricus</i> (Pečárka) | 10 |
| 1.1.2 Rod <i>Macrolepiota</i> (Bedla) | 11 |
| 1.2 Čeleď Clavariaceae (Kyjankovité) | 11 |
| 1.2.1 Rod <i>Clavariadelphus</i> (Kyj) | 12 |
| 1.3 Čeleď Cortinariaceae (Pavučincovité) | 12 |
| 1.3.1 Rod <i>Cortinarius</i> (Pavučinec) | 12 |
| 1.3.2 Rod <i>Hebeloma</i> (Slzivka) | 12 |
| 1.3.3 Rod <i>Pholiota</i> (Šupinovka) | 13 |
| 1.4 Čeleď Entolomataceae (Závojenkovité) | 13 |
| 1.4.1 Rod <i>Clitopilus</i> (Mechovka) | 13 |
| 1.4.2 Rod <i>Entoloma</i> (Závojenka) | 14 |
| 1.5 Čeleď Paxillaceae (Čechratkovité) | 14 |
| 1.5.1 Rod <i>Paxillus</i> (Čechratka) | 14 |
| 1.6 Čeleď Pleurotaceae (Hlívovité) | 15 |
| 1.6.1 Rod <i>Pleurotus</i> (Hlíva) | 15 |
| 2. OBSAHOVÉ LÁTKY HUB | 16 |
| 2.1 Primární metabolity | 16 |
| 2.1.1 Úvod | 16 |
| 2.1.2 Sacharidy | 16 |
| 2.1.3 Lipidy | 16 |
| 2.1.4 Proteiny | 17 |
| 2.1.5 Minerální látky | 17 |
| 2.1.6 Vitamíny | 17 |
| 2.2 Sekundární metabolity | 18 |
| 2.2.1 Úvod | 18 |
| 2.2.2 Barviva | 18 |
| 2.2.3 Pach a vůně hub | 18 |
| 2.3 Sekundární metabolity u sledovaných taxonů | 19 |
| 2.3.1 <i>Agaricus bitorquis</i> | 19 |
| 2.3.2 <i>Agaricus vaporarius</i> | 20 |
| 2.3.3 <i>Clavariadelphus pistillaris</i> | 20 |
| 2.3.4 <i>Hebeloma sinapizans</i> | 20 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.3.5 | <i>Pholiota alnicola</i> | 22 |
| 2.3.6 | <i>Clitopilus prunulus</i> | 23 |
| 2.3.7 | <i>Paxillus involutus</i> | 24 |
| 2.3.8 | <i>Pleurotus ostreatus</i> | 25 |
| 3. | SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA | 27 |
| 3.1 | Volné radikály a antioxidanty | 27 |
| 3.1.1 | Volné radikály | 27 |
| 3.1.2 | Antioxidační ochranný systém | 28 |
| 3.1.3 | Antioxidační terapie | 28 |
| 3.2 | Sekvenční injekční analýza | 28 |
| 3.2.1 | Stanovení antioxidační aktivity | 30 |
| 3.2.2 | Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu | 31 |
| IV. | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY | 33 |
| 1. | POMŮCKY | 33 |
| 1.1 | Rozpouštědla | 33 |
| 1.2 | Chemikálie | 33 |
| 1.3 | Přístroje | 34 |
| 2. | PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ | 35 |
| 2.1 | Použitý materiál | 35 |
| 2.2 | Postup přípravy lyofilizátu | 35 |
| 2.3 | Schéma přípravy lyofilizátu | 36 |
| 3. | DETEKČNÍ ČINIDLA PRO TENKOVrstvou CHROMATOGRAPHII | 37 |
| 4. | SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA | 42 |
| 4.1 | Stanovení antioxidační aktivity DPPH testem pomocí SIA | 42 |
| 4.2 | Hodnoty naměřených antioxidačních aktivit u sledovaných taxonů | 43 |
| 5. | HODNOCENÍ EXTRAKTŮ | 49 |
| 5.1 | Hodnocení extraktů tenkovrstvou chromatografií | 50 |
| 5.2 | Vyhodnocení reakcí na detekce | 74 |
| V. | DISKUSE | 79 |
| VI. | LITERATURA | 84 |

I. ÚVOD

Vědecký latinský název hub (Mycota nebo Mycetes) získaly houby na základě starého řeckého názvu žampiónu - mykos, který byl znám již starým Řekům a uvádí se v pracích otce botaniky, řeckého vědce Theofrasta, který žil ve 3.- 4. století před našim letopočtem.

Mnoho druhů hub obsahuje látky, které škodí lidskému organismu. Ukazuje se, že druhy dřívě běžně sbírané a používané nejsou tak nevinné, jak se původně předpokládalo. Nejde tu pouze o bezprostředně působící toxické látky, které vyvolávají akutní otravu, ale také o další, většinou neznámé toxiny, které se mohou v lidském těle opakovaným požíváním některých hub hromadit a nepříznivě narušovat činnost různých orgánů, zejména zažívacích.

Během posledních 50 let došlo k několika pokrokům v medicíně díky nižším organismům jako jsou plísně, kvasnice a houby. První antibiotika byla extrahována z hub. Penicilin, tetracyklin a aureomycin byly odvozeny z plísní. Byly považovány za zázračné léky k léčbě infekcí. Také velkým pokrokem bylo použití cyklosporinu, který byl odvozen z houby (využívající hmyz jako svého hostitele). Cyklosporin tlumí imunitní systém pacientů s transplantací (snižuje riziko odmítnutí transplantátu tkání). Tyto nižší organismy jsou používány v komerční sféře k produkci chleba, piva, vína, sýrů, organických kyselin a vitamínů.

Houby jsou cennou, zdravou potravou s nízkou kalorickou hodnotou, bohaté na proteiny, chitin, železo, zinek, vlákninu, esenciální aminokyseliny, vitamíny a minerály. Houby mají dlouhou historii použití v tradiční čínské medicíně. Jejich legendární účinky v podpoře dobrého zdraví, vitality a zvýšení adaptačních schopností těla jsou podpořeny i dřívějšími studiemi. Tyto studie mají za to, že houby jsou probiotiky, tedy, že pomáhají našemu tělu být silnějším a bojují proti nemocem udržováním fyziologické homeostázy (zachováním rovnováhy těla a přirozenou odolností vůči nemocem).

Látky, které obsahují jsou klasifikovány jako „zesilovače ochrany hostitele“

(z anglického host defence potentiators-HDP), které mají schopnost posílit imunitní systém. To je jedním z důvodů, proč jsou v současné době používány jako pomocné látky při léčbě rakoviny v Japonsku a Číně. V Japonsku, Rusku, Číně a USA, bylo vyvinuto několik odlišných antitumorózních látek (polysacharidy), které byly získány

z hub jako *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Flammulina velutipes* apod.

Například *Ganoderma lucidum* (Reishi) má inhibiční efekt na růst tumorů, z jiných studií vyplývají účinky analgetické, antiflogistické, antioxidační, antivirotické (skrze indukci produkce interferonu), antihypertonické, kardiotonické (snížením hladiny cholesterolu), expektorační, detoxikační a hepatoprotektivní, antibakteriální a také aktivita proti viru HIV.

Lentinan (z *Lentinus edodes* čili Shiitake) je již po staletí nazýván elixírem života. V Japonsku je zapsán jako lék proti rakovině zdejší FDA. Lentinan vykazuje určité účinky při rakovině střev, rakovině jater, žaludku, vaječnicků a rakovině plic. Lentinan stimuluje produkci T lymfocytů a NK buněk a může potenciovat účinky protivirové léčby AIDS. *Lentinus edodes* také snižuje tlak krve, hladinu cholesterolu, zvyšuje libido a také stimuluje produkci interferonu.

Cordyceps sinensis může být silným stimulantem makrofágové aktivity, zesílením schopnosti imunitního systému bojovat proti bakteriálním a virovým infekcím.

Studie prováděné na lidských dobrovolnících prokázaly účinky snižující hladinu cholesterolu, účinky na arytmiie, léčbu rakoviny plic a léčbu chronického ledvinného selhání. Také byl zaznamenán účinek na relaxaci hladkého svalstva. Toto může být zvláště nápomocné při léčbě chronického kašle, astmatu a dalších bronchiálních potíží.

Nedávné studie prokázaly, že *Tremella fuciformis* (Bai mu erh) stimuluje imunitní systém. Jiné studie říkají, že tato houba má antitumorózní účinek, snižuje hladinu cholesterolu, chrání játra a její protizánětlivý účinek může zpomalit proces stárnutí.

Grifola frondosa (Maitake) vykazuje také stimulační účinek na imunitní systém a je účinná proti některým tumorům.

Mnohé z látek obsažených v těchto houbách jsou klasifikovány jako „zesilovače ochrany hostitele“ čili imunomodulátory. Většina studií účinků hub na člověka je zaměřena na účinku zesílení imunitního systému.

II. CÍL PRÁCE

Tato rigorózní práce navazuje na mou diplomovou práci, která se zabývala fytochemickým výzkumem 14 taxonů stopkovýtusných hub. Cílem rigorózní práce bylo najít informace týkající se obsahových látek sledovaných taxonů a zjistit antioxidační aktivitu pomocí DPPH testu s využitím sekvenční injekční analýzy. Také jsem rozšířila základní fytochemický screening obsahových látek (pomocí TLC) o osm dalších reakcí s činidly selektivními pro určité skupiny látek.

III. TEORETICKÁ ČÁST

1. SYSTEMATICKÉ ZAŘAZENÍ A CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÝCH TAXONŮ

Vysvětlení některých pojmů:

Houby jedovaté : Ve všech stádiích svého vývoje obsahují v plodnicích jedovaté látky = toxiny, které vyvolávají otravy.¹

Houby nejedlé: Jsou to např. takové, které mají nepříjemnou (často hořkou) chuť či zápach. Takové houby je lépe v zájmu předcházení nepříjemnostem rovněž nezkoušet.¹

Houby podmíněně jedlé: Tyto houby lze použít k jídlu pouze po určité úpravě. Podmíněně jedlé jsou čechratky (*Paxillus*), přičemž ve vztahu k těmto houbám se zjistila individuální citlivost jednotlivců. Jedni je používají k jídlu bez nepříznivých následků, jiní je nesnášejí. V čechratkách je totiž obsažena látka zatím přesně nezjištěného druhu, která na některé jednotlivce působí negativně. Vařením se však zcela odstraňuje.¹

Houby jedlé: Jedlé i bez úpravy.¹

Sledované houby v této práci patří do šesti čeledí: čeleď Agaricaceae

čeleď Clavariaceae

čeleď Cortinariaceae

čeleď Entolomataceae

čeleď Paxillaceae

čeleď Pleurotaceae

Společné :

Říše: Fungi

Oddělení: Eumycota (Houby vlastní = Houby pravé)

Pododdělení: Basidiomycotina

Třída: Basidiomycetes (Houby stopkovýtrusé)

Podtřída: Homobasidiomycetidae (Houby vyšší stopkovýtrusé)

Řád: Agaricales

- Čeleď: Agaricaceae → Rod: *Agaricus bitorquis*
Agaricus squamulifer
Agaricus vaporarius
Macrolepiota bohemica
- Čeleď: Cortinariaceae → Rod: *Cortinarius anomalus*
Hebeloma sinapizans
Pholiota alni
- Čeleď: *Entolomataceae* → Rod: *Clitopilus prunulus*
Entoloma clypeatum
- Čeleď: Pleurotaceae → Rod: *Pleurotus dryinus*
Pleurotus ostreatus

Řád: Cantharellales

- Čeleď: Clavariaceae → Rod: *Clavariadelphus pistillaris*

Řád: Boletales

- Čeleď: Paxillaceae → Rod: *Paxillus involutus*
Paxillus rubicundulus

1.1. Čeleď Agaricaceae (Pečárkovité)

1.1.1 Rod Agaricus (Pečárka)

Statné, střední i drobné pozemní masité houby s kloboukem v mládí podvinutým, hladkým nebo přitiskle šupinatým, suchým. Z blanitého vývoje je na třeni vždy prsten. Většina druhů je jedlých, některé neobyčejně chutné a cenné. Některé (např. pečárka zápašná) způsobují lehčí otravy.²

Agaricus bitorquis syn. *Agaricus Rodmani* (Quélet) Saccardo³

Pečárka pochvatá (Žampion pochvatý)

Výskyt: s oblibou na okrajích silnic ve městech, někdy i v lese, jednotlivě nebo i v malých skupinách, především na písčítých půdách, od května do září

Jedlá⁴



obr. č. 1

Agaricus squamulifer (Moell) Moell ⁵

Pečárka šupinkatá

Výskyt: roste na travnatých, holých místech v lesích, i mimo ně, v parcích a alejích, dává přednost vápenatému substrátu, od června do listopadu

Jedlá ⁶



obr. č. 2

Agaricus vaporarius (Pers. Ex Vitt) Moser ⁷

Pečárka rumištní (pařeništní)

Výskyt: na rumištních stanovištích, zahradách, parcích, v příkopech cest, také v listnatých a jehličnatých lesích, na půdě vyhnojené živinami, bohaté humózní půdě a na kompostech

Jedlá ⁸



obr. č. 3

1.1.2 Rod *Macrolepiota* (Bedla)

Pozemní, velmi vysoké i drobné houby, většinou štíhlé, bez pochvy a zbytků plachetky na klobouku. Velké druhy jsou jedlé, drobné nemají praktický význam a některé jsou i jedovaté.²

Macrolepiota bohemica (Wich) Krieglst. et Pázmány ⁹

Bedla zahradní (česká)

Výskyt: roste v zahradách, na loukách, na živinami bohatých půdách, od léta do podzimu

Nejedlá



obr. č. 4

(v praxi byla tato houba konzumována a nedošlo k toxickým příznakům)¹⁰

1.2. Čeleď *Clavariaceae* (Kyjankovité)

1.2.1 Rod *Clavariadelphus* (Kyj)

Nezvyklý tvar mají houby z rodu kyj (*Clavariadelphus*). Jsou kyjovité nebo trubkovité, okrově žluté nebo rezavé, někdy tvaru paličky.¹

Clavariadelphus pistillaris (Fr.) Donk¹¹

Kyj Herkulův

Výskyt: je rozšířený po celém světě, roste na půdách bohatých na živiny, na vápenci, plodnice od léta do podzimu

Nejedlý²



obr. č. 5

1.3. Čeleď Cortinariaceae (Pavučincovité)

1.3.1 Rod *Cortinarius* (Pavučinec)

U mladých plodnic jsou mezi třenem a okrajem klobouku natažena bílá, tenoučká vlákna závoje (kortiny), podobající se pavučině - podle nich má rodové jméno pavučinec (*Cortinarius*).¹

Cortinarius anomalus (Fr.ex Fr.) Fr.¹²

Pavučinec odchylný

Výskyt: hojně na podzim v lesích listnatých i smíšených

Jedlý²



obr. č. 6

1.3.2 Rod *Hebeloma* (Slzivka)

Většinou prostřední nebo malé pozemní houby, bělavé, žemlové či hnědavé s málo klenutými a obvykle slizkými klobouky.⁶

Intoxikace druhů tohoto rodu je provázena typickým symptomem ospalosti do 30 minut s procitnutím, s velkými bolestmi břicha, průjmem a zvracením. *Hebeloma crustuliniforme* (Bull ex Fr.) Qué. produkuje cytotoxickou triterpenovou kyselinu hebelomovou A. *Hebeloma sinapizans* obsahuje stejný metabolit, jehož působení vede k rozvinutí gastroenteritidy.¹³

Hebeloma sinapizans (Pantet: Fr) Gill. ¹⁴

Slzivka ředkvičková

Výskyt: dosti hojně v listnatých
a smíšených lesích, zejména pod buky
a duby, na vlhkých a živných půdách
Nejedlá ⁶



obr. č. 7

1.3.3 Rod *Pholiota* (Šupinovka)

Mnohé houby mají své dvojníky. U václavky se kromě třepenitek můžeme setkat ještě s jedním nejedlým dvojníkem. Je to šupinovka olšová (*Pholiota alnicola*). Stejně jako václavka roste i šupinovka skupinově na pařezech listnáčů, především olše, nebo v jejich nejbližším okolí. Na rozdíl od václavky nemá šupinovka olšová nikdy prsten na třeni, klobouk má leskle slámově žlutavý a její dužnina vydává silný nepříjemný zápach. Klobouk mívá často po okrajích zelenavý odstín a lupeny jsou zprvu zelenožluté, pak rezavé. ¹

Pholiota alnicola (Fr.) Singer ¹⁵

Šupinovka olšová

Výskyt: nejčastěji mimo les, na patách stromů a
pařezů listnatých, hlavně olší, vzácněji i jehličnanů
Nejedlá ²



obr. č. 8

1.4. Čeleď Entolomataceae (Závojenkovité)

1.4.1 Rod *Clitopilus* (Mechovka)

Prostřední nebo malé, většinou bílé houby vzhledu strmělek nebo kalichovek anebo malých hlív. Jsou většinou sbíhavé, nízké, bělavé a pak růžové. Příslušníci tohoto rodu jsou až na mechovku obecnou velmi vzácné a bývají zařazováni do různých rodů. ²

Clitopilus prunulus (Scop.: Fr.) Kummer ¹⁶

Mechovka obecná

Výskyt: v lesích listnatých i jehličnatých a na lesních lukách, hojně v létě a na podzim

Houba s bílým kloboukem a silnou moučnou vůní roste zejména v červenci.

Jedlá ¹



obr. č. 9

1.4.2 Rod *Entoloma* (Závojenka)

Pozemní houby prostřední velikosti, barev většinou bělavých nebo šedavých. Některé druhy jsou jedlé, jiné zase prudce jedovaté jako např. nejznámější závojenka olovová.²

Entoloma clypeatum (L.) Kummer ¹⁷

Závojenka podtrnka

Výskyt: jednotlivě či častěji ve skupinách, na jaře od dubna do června

Jedlá ²



obr. č. 10

1.5. Čeleď Paxillaceae (Čechratkovité)

1.5.1 Rod *Paxillus* (Čechratka)

Velké, menší masité houby s krátkým třeněm nebo bez třeně. Jedlé, nejedlé i jedovaté.²

Paxillus involutus (Batsch.: Fr) Fr. ¹⁸

Čechratka podvinutá

Výskyt: ve všech lesích, stromořadích a sadech

Jedovatá ²



obr. č. 11

Paxillus rubicundulus P.D.Orton ¹⁹

Čechratka olšová

Výskyt: roste nehojně na vlhkých místech pod olšemi, od června do listopadu

Jedlý ⁶



obr. č. 12

1.6. Čeleď Pleurotaceae (Hlívovité)

1.6.1 Rod Pleurotus (Hlíva)

Středně velké houby rostoucí jednotlivě nebo v trsech na dřevinách. Jedlá a chutná je hlíva ústříčná.²

Pleurotus dryinus (Pers.: Fr.) Kummer ²⁰

Hlíva dubová

Výskyt: roste dosti hojně na kmenech a pařezech listnáčů, zejména dubů, buků, topolů, jabloní, ale i jehličnanů, od srpna do listopadu

Jedlá ⁶



obr. č. 13

Pleurotus ostreatus (Jacq.: Fr) Kummer ²¹

Hlíva ústříčná

Výskyt: obecně rozšířená, v trsech škeblovitě nad sebou, saprofytický a parazitický na listnatých dřevinách, vývoj probíhá ve dvou fázích (od září do prosince a pak na jaře)

Jedlá ²



obr. č. 14

2. OBSAHOVÉ LÁTKY HUB

Lze rozlišit primární a sekundární metabolity.

2.1 PRIMÁRNÍ METABOLITY

2.1.1 Úvod

Stěny buněk jsou většinou vybudovány z chitinu, vysokomolekulární dusíkaté látky, která je velmi těžko porušitelná zažívacími žaludečními šťávami (je tedy nestravitelný, ale zvyšuje pohyb střev, čímž podporuje lepší trávení), a je složená z aminocukrů (zejména poly-N-acetylglukosaminu). U některých hub jsou však tyto stěny utvořeny z polymerních (složitých) cukrů, mannanů a glukánů, a někdy i z bílkovin. Plazma buněčná obsahuje v malém množství cukry, rozpustné i rezervní, a tuky, které dohromady tvoří hlavní bázi výživných látek organismu houby. Největší procento váhy hub tvoří však voda, obsažená zejména v plazmě, již mají houby 70 - 95 %; proto sušením pozbývají asi až 90 % vlastní váhy.²

2.1.2 Sacharidy

Houby obsahují 1 – 6 % cukrů, a to jednak jako tzv. membránové cukry (tvoří stěny buněk), jednak jako rezervní cukry, zejména glukany, mannany a galaktany (glukan z hub se velmi podobá jaternímu polymernímu cukru glykogenu, a proto se také někdy nazývá glykogen) a rozpustné cukry, z nichž nejdůležitější je trehalóza (90 % všech rozpustných cukrů), doprovázená cukernými alkoholy volemitolem, mannitolem sorbitolem, erythritolem a arabitolem, a v určitých případech i dalšími sloučeninami. Slizové látky jsou rovněž tvořeny cukry: polyuronidy (glukuronidy) a pentozany (v průměru 7 %).²

2.1.3 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, anebo obdoby vosků, jednak glykolipidy. Tyto lipidní látky tvoří asi 0,5 – 1,5 % hmotnosti houby, někdy však daleko více.²

2.1.4 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 a jsou tak příčinou toxicity starých jedlých hub. Nejvíce bílkovin je v mladých plodnicích.²

2.1.5 Minerální látky

Z minerálních látek, které se starají o udržení iontové rovnováhy v plazmě, jsou nejhodnější sloučeniny draslíku a fosforu.² Dalšími prvky jsou S, Mg - zdroji jsou zejména jejich soli jako např. $MgSO_4$, K_3PO_4 . V houbách je mnohem více minerálních látek než v zelených rostlinách. Množství záleží na místě růstu, složení půdy, věku a druhu houby. Houby však vstřebávají ze svého okolí také nežádoucí prvky jako je olovo, rtuť, arzen, atd.²²

2.1.6 Vitamíny

Houby obsahují některé vitamíny, především provitamin A čili β -karoten. Nejvíce je ho v lišce obecné. Vitamínu B₁ a B₂ je nejvíce v hříbech.²² Vitamíny jsou látkami důležitými pro růst - (zejména ze skupiny B, na thiaminu dost závisí metabolismus dusíku), purinové a pyrimidinové báze, některé houby potřebují získávat ze substrátu aminokyseliny, které samy nejsou schopny tvořit.²³

2.2 SEKUNDÁRNÍ METABOLITY

2.2.1 Úvod

Sekundární metabolity - látky, jež nejsou spojeny s metabolismem primárním (anabolické a katabolické procesy v obecných rysech společné pro všechny formy života) a jsou produkovány jen za určitých podmínek, bez patrného účelu.²⁴

2.2.2 Barviva

Houby hýří pestrými barvami, především holubinky, muchomůrky, čirůvky aj. Barva většiny hub je podmíněna přítomností různých barviv, která jsou v plazmě nebo ve vakuolách buněk, anebo na jejich povrchu, kde bývají v podobě krystalků. Jindy zase jsou zbarveny stěny hyf. Pozoruhodná je změna barevnosti houby na různých částech plodnice během vývoje; u celé skupiny pavučinců je barevná proměnlivost tak veliká, že přivádí laika v rozpaky, neboť mladé exempláře jsou zcela jinak zbarvené než dospělé či staré. Dužnina čechratky podvinuté barví vodu do tmavohněda. Bílá barva u hub (podhoubí, výtrusného prachu, plodnic nebo jejich částí) není způsobena bílým barvivem, ale vzduchem - podobně jako u sněhu - kde vzduch vyplňuje dutinky, např. mezihyfové prostory apod. Vyplní-li se tyto dutinky vodou, bílá barva většinou mizí a mění se ve sklovitě bezbarvou (hyalinní).

Houby jsou zbarveny řadou barviv, které patří do různých skupin organických sloučenin. Xanthony jsou příčinou žlutého zbarvení hub, některé deriváty piperazinu a pyrazinu způsobují jejich červené zbarvení, jeden chemovar klanolístky obecné (*Schizophyllum commune*), pěstovaný na dusíkaté živné půdě, produkuje indigo.

Nejcharakterističtějšími barvivy jsou chinoidní látky: benzochinony mají většinou barvu žlutou, někdy až červenou, naftochinony bývají červené a přecházejí do tmavších tónů, kdežto antrachinony jsou modré až černé.²

2.2.3 Pach a vůně hub

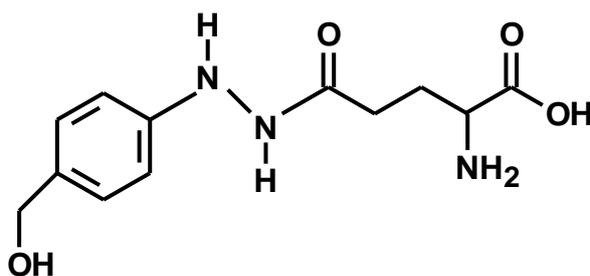
Pach (vůně) je důležitý systematický znak u hub - je většinou velmi stálý, a proto se dobře hodí k určování mnoha druhů. Tzv. typický houbový pach až doposud nebyl připsán žádné chemické sloučenině. Ovšem mnoho hub má zvláštní nehoubový pach, např. kořený (zápach po mleté hořčici), anýzový (anisaldehyd), ovocný (příčinou jsou estery; např. banánovou vůni *Endoconidiophora coerulescens* způsobuje isobutylacetát). Příčinou odporného zápachu hub bývají nízké aminy. Důležitý pach je

vůně okurkově moučná (podle běžného třídění v literatuře), kterou má např. mechovka obecná (*Clitopilus prunulus*) a mnoho jiných hub.²

2.3 SEKUNDÁRNÍ METABOLITY U SLEDOVANÝCH TAXONŮ

2.3.1 *Agaricus bitorquis*

Agaritin tzn. N-(γ -l (+) glutamyl)-4-hydroxymethyl-fenylhydrazin byl identifikován a kvantifikován vysokotlakou kapalnou chromatografií a použit jako marker výskytu fenylhydrazinových derivátů v kultivovaných houbách *Agaricus bitorquis* a *Agaricus hortensis*. Nicméně relativně vysoké hladiny agaritinu (okolo 700 mg.kg⁻¹) mohou být nalezeny v čerstvě sbíraných houbách *A.bitorquis* z ranných porostů, vzorky ze supermarketů obsahují méně agaritinu. Složení 28 vzorků se různilo od 165 do 457 mg.kg⁻¹ s průměrem okolo 272±69 mg.kg⁻¹. Nejvyšší množství agaritinu bylo nalezeno na kůži klobouku a v lupenech, nejnižší v třeni. Nebyly nalezeny žádné významné rozdíly v obsahu agaritinu u těchto 2 druhů v této studii. V závislosti na druhu kuchyňské úpravy pěstovaných hub rodu *Agaricus* se redukuje obsah agaritinu na různé úrovně. Suché pečení hub – proces podobný pečení pizzy redukuje obsah agaritinu na zhruba 25 %, kdežto smažení na oleji či másle či fritování má za výsledek větší pokles (35-70 %). V mikrovlnné troubě se obsah redukuje na 1/3 původní hladiny. Takže expozice agaritinu je podstatně nižší při konzumaci upravených, než syrových hub. Není ještě známo do jaké míry se agaritin a jiné fenylhydrazinové deriváty vyskytují v pěstovaných houbách, nicméně jsou degradovány na jiné biologicky aktivní sloučeniny během procesu vaření.²⁵



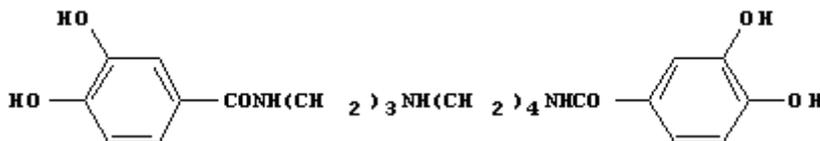
agaritin²⁵

2.3.2 *Agaricus vaporarius*

Agaritin, přirozeně se vyskytující fenylyhydrazinový derivát v pěstovaných bílých houbách rodu *Agaricus bisporus* je považován za potenciálně zdravotně závadný. Konzumenti měli na výběr jiné jedlé houby, které neobsahují tuto sloučeninu. Studie distribuce agaritinu v rodě *Agaricus* odhalila, že tato sloučenina je obvykle doplněna formylfenylyhydrazinovým analogem agaritinalem, který byl do této doby izolován z luční houby *A. campester*. Členové příbuzného rodu *Lepiota* a *Coprinus*, ani halucinogenní houby, které jsou se stoupající tendencí rekreačně používány v Evropě, ale agaritin neobsahují. Výskyt tohoto potenciálního toxinu je správně spojován s rodem *Agaricus*.²⁶

2.3.3 *Clavariadelphus pistillaris*

Z houby *Clavariadelphus pistillaris* a několika druhů rodu *Ramaria* byla izolována hořká substance pistillarin, který je zodpovědný za zelenou barevnou reakci hub s FeCl_3 . Pistillarin jen N_1, N_8 -bis (3,4-dihydroxybenzoyl) spermidin.²⁷

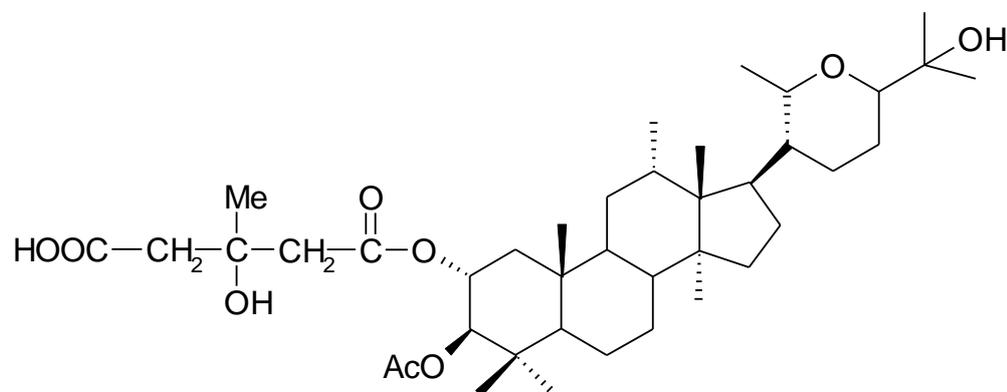


pistillarin²⁷

2.3.4 *Hebeloma sinapizans*

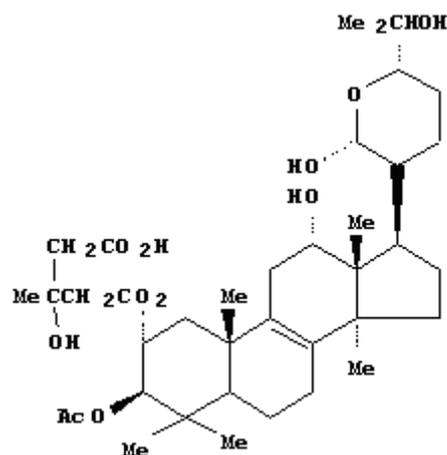
Kyselina hebelomová A, obsažená v těchto druzích: *Hebeloma spoliatum*, *Hebeloma crustuliniforme* a v *Hebeloma sinapizans*, se získává a čistí tímto způsobem: Suché houby se nalámou na malé kousky a extrahují se methanolem za laboratorní teploty. Methanolvý extrakt se po zahuštění digeruje směsí methanol-aceton (3:5, v/v). Vzniknou dvě vrstvy – tekutina a sedlina. Kapalná fáze byla chromatografována na sloupci silikagelu. S CHCl_3 -MeOH (100:1), (100:1), (50:1), (15:1) a (5:1, v/v) k získání pěti frakcí. Biologická aktivita: toxická pro myši, intraperitoneální dávka 100 mg/kg

vede ke smrti po paralýze končetin. Objevuje se relaxace hladkého svalstva jako po papaverinu.²⁸



kyselina hebelomová A²⁸

Cytotoxický triterpen lanostanu 3 β -acetyl-2 α -(3'-hydroxy-3'-methylglutaryl) krustulinol byl izolován z *Hebeloma crustuliniforme* a *Hebeloma sinapizans*. Jeho struktura byla detekována chemickými a spektrálními metodami.²⁹

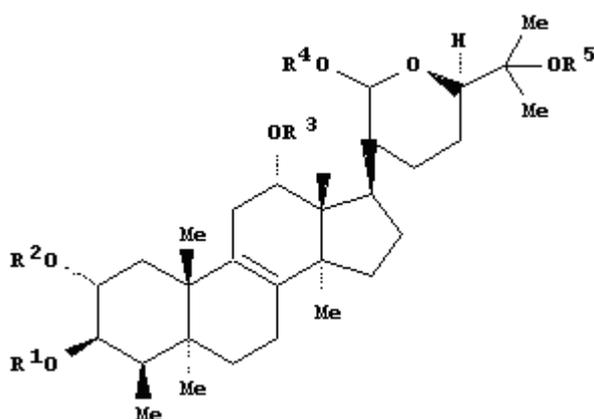


krustulinol²⁹

Tři metabolity pracovně nazvané HS-A, HS-B, HS-C byly izolovány z houby *Hebeloma spoliatum*, jejich účinek je pro myši fatálně toxický. HS-A byl identifikován jako 3-acetyl-2-(3'-hydroxy-3'-methyl)glutarylkrustulinol, který byl izolován z *Hebeloma crustuliniforme* a *Hebeloma sinapizans* jako cytotoxický původce. HS-B a HS-C byly odvozeny jako 3,21-diacetyl-2-(3'-hydroxy-3'-methyl) glutarylkrustulinol a 3-acetyl-2-(3'-hydroxy-3'-methyl)glutarylhydrokrustulinol (vycházelo se z jejich chemických a

spektrálních dat). Intraperitoneální podání HS-A, HS-B a HS-C v dávce 100 mg/kg způsobí smrt po paralýze končetin myši. Tyto sloučeniny způsobující relaxaci myšního střeva jako po podání acetylcholinchloridu či chloridu barnatého *in vitro*. Objevuje se relaxace jako po papaverinu.³⁰

Bylo zjištěno, že substituované deriváty lanostanu mají schopnost inhibovat 3 α -hydroxysteroid dehydrogenázu a dají se použít při léčbě a profylaxi zánětlivých onemocnění.³¹



31

Homologická řada sudých a lichých n-alkanů (C₁₅-C₃₂) byla identifikována u 5 druhů hub. Množství celkových uhlovodíků se pohybovalo od 15 do 130 mg / 100 g čerstvé mokré tkáně, závisující na druhu. Množství n-alkanů se pohybovalo v rozmezí 37,1 do 60,2 % celkových uhlovodíků. Nepatrná převaha sudých byla nalezena v *Hebeloma sinapizans*. U *Hebeloma crustuliniforme* byly tyto distribuovány v vyrovnaných množstvích. Všechny druhy hub ukázaly neobvykle vysoký obsah sudých n-alkanů. Nenasycené n-alkeny nebyly detekovány. Uhlovodíky byly separovány a identifikovány IČ spektrometrií a plynovou chromatografií.³²

2.3.5 *Pholiota alnicola*

Existuje studie zabývající se antioxidační aktivitou patnácti stopkovýtrusých hub. Mezi testované houby patří i *Pholiota alnicola*. Testované vzorky mycelií (tekuté kultury-CL a myceliální biomasa-MB) mají určitý antioxidační potenciál, kterým inhibují reakce volných peroxidových radikálů lipidů v mozковém homogenátu potkana. Aktivita byla

pozorována 21.den myceliální kultivace. Relativně vyšší indikátory antioxidační aktivity byly detekovány, když se tekuté vzorky kultur *Pholiota alnicola* a dalších 4 hub a vzorky *Volvariella bombycina*, *Lepista personata* použily jako antioxidanty. Tyto druhy mohou být doporučeny pro další screening k získání přirozených antioxidačních doplňků stravy.³³

2.3.6 *Clitopilus prunulus*

Mnoho hub je toxických pro hmyz. Jednou z nich je *Clitopilus prunulus* –. K identifikaci sloučenin s insekticidní aktivitou byla studována toxicita 14 druhů. Získané údaje nám říkají, že peptidy jsou odpovědné za většinu insekticidní aktivity těl hub a mohou být zdrojem genů použitých pro ochranu rostlin proti hmyzu. Mezi proteiny, lektiny a hemolysiny byly vhodné kandidáti na insekticidy, protože jejich toxický účinek nebyl navozen proteázou.³⁴

29 těkavých látek z deseti zmrazených hub pocházejících z Francie (mimo jiné také *Clitopilus prunulus*, *Hebeloma radicosum*, *Pholiota apicrea*...), bylo identifikováno pomocí plynové chromatografie-hmotnostní spektrometrie. Hlavními komponentami byly 1-okten-3-ol, benzaldehyd, 2-fenylethanol, (E,E) – 2,4-dekadienal a (E,Z) – 2,4-dekadienal. Lysidin, δ -kadinen, (Z)-sabinen hydrát a (E)-sabinen hydrát byly identifikovány poprvé v houbách.³⁵

Trans-2-nonenal byl identifikován plynovou chromatografií-hmotnostní spektrometrií jako okurková vůně v podskupině hub s okurkově-moučnou vůní. Trans-2-nonenal nebyl nalezen v čistě moučně nebo žlukle, olejnatě nebo rybo-moučně vonících variacích této houbové vůně. Takže vůně popsaná jako okurkově-moučná je platnou kategorií. Rozmačkání hub před analýzou zvyšuje množství trans-2-nonenalu a ostatních nestálých látek. Druhy hub zahrnuté do tohoto experimentu jsou *Clitopilus prunulus*, *Tricholoma virgatum*, *Entoloma madidum* a jiné.³⁶

Ze 100 stopkovýtrusých hub, bylo nalezeno 7 silně aktivních druhů proti růstu *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Byl použit nový sladový střední pepton. Aktivními druhy jsou *Clitopilus prunulus*, *Pleurotus palmatus* a jiné.³⁷

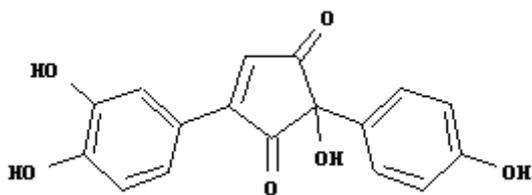
2.3.7 *Paxillus involutus*

Paxillus involutus (Batsch.: Fr.) Fr. z čeledi Paxillaceae, řádu Boletales je druh, který v jedné části světa je uznávanou jedlou houbou (především v USA), ve druhé je jednoznačně chápán jako jedovatý druh (Evropa, Japonsko). Mnoho druhů čechratky způsobuje nespecifické GIT onemocnění, ale to není pravý "Paxillus syndrom". Syndrom je imunohemolytickou anémií způsobenou dlouhodobou konzumací čechratky. Obvykle se u pacientů objevují nesrovnalosti až po několika letech. Toto je skutečná alergie na jídlo, nikoliv otrava. Syndrom otravy charakterizuje pocit chladu v končetinách, křeče v břišní oblasti, pocení, slabost a kóma. Je též popisován cirkulační kolaps, tuková degenerace kosterního svalstva, srdce, jater a ledvin. Houba je pravděpodobně příčinou dvou druhů intoxikací – první je charakterizována efektem na GIT a je vyvolána špatnou kuchyňskou úpravou houby, druhý typ je imunohemolytickou reakcí, která se klinicky projevuje žloutenkou, oligurií, anurií, hemoglobinurií a poškozením parenchymu ledvin, postihuje osoby s hypersenzitivitou k metabolitům houby.¹³

Ektomykorrhizální houby mohou produkovat antifungální sloučeniny *in vitro* také v symbióze s hostitelskou rostlinou, která může redukovat nemoci kořenů. Cílem této studie bylo izolovat antifungální sloučeniny z filtrátu kultury *Paxillus*, která může tvořit mykorrhizu se semenáčky *Picea glehnii*. Filtrát kultury vykazuje antifungální aktivitu proti *Pythium vexans* při pH 3-4, ale ne při pH 5-10. Nicméně antifungální aktivita individuálních frakcí byla nižší než filtrátu, směs těchto frakcí vykazovala antifungální aktivitu podobnou filtrátu. Antifungální aktivita kyseliny šťavelové, která je produkována houbou *Paxillus involutus* byla zvýšena mícháním s vodným roztokem fenolické frakce. Výsledky studie indikují, že kultury *Paxillus* produkují organické kyseliny a ve vodě rozpustné fenolické látky, které dohromady vykazují antifungální aktivitu proti *Pythium vexans* při pH 3-4.³⁸

Nový opticky aktivní metabolit involuton byl nalezen v metanolovém, etanolovém, nebo n-butanolovém extraktu z čerstvě sbíraných hub *Paxillus involutus*. Struktura této látky byla dokázána na základě spektrálních a chemických vlastností involutonu a jeho tetraacetylových derivátů. Kromě řady sloučenin se známou strukturou, jako linolová kyselina, krotonová kyselina, mannitol, ergosterol, involutin, také methylované, ethylované či n-butylované O-D-glukopyranosidy, nebo linoleaty se stejnými alkoholy,

v závislosti na použitém alkoholu při extrakci, byly tyto také izolovány v čisté formě z houby.³⁹



involuton³⁹

2.3.8 *Pleurotus ostreatus*

Přesto, že hlíva ústříčná obsahuje řadu alergenů, je známa obsahem cytolytického proteinu. Vodný extrakt z hlívy ústříčné obsahuje toxin (pleurotolysin), který je lytický pro savčí erythrocyty *in vitro*. Pleurotolysin je protein s izoelektrickým bodem 6,4 a molekulovou hmotností okolo 12,047 kDa. Maximální hemolytickou aktivitu vykazuje okolo pH 7. Neobsahuje cystein, histidin, arginin, prolin, tyrosin, fenylalanin a methionin, které jsou aminokyselinami obsaženými v jiných proteinech. Složení pleurotolysinu je blízké včelímu jedu mellitinu nebo stafylokokovému delta toxinu více než ostatní houbová lytika. Hemolýza indukovaná touto sloučeninou je inhibována lipozómy připravenými z cholesterolu (dicetylfosfátem a sfingomyelinem). Citlivost pro hemolýzu je závislá na obsahu sfingomyelinu v membránách erythrocytů. Ovčí erythrocyty, které mají relativně vysoký obsah sfingomyelinu, jsou méně citlivé, než lidské, psí, nebo krysí erythrocyty. Mechanismus účinku je neznámý, ale zdá se, že se pleurotolysin chová více jako detergent, než jako enzym.⁴⁰

Pleurotus ostreatus se užívá i v kosmetice pro svou schopnost odstraňovat melaninový pigment z kůže. Kosmetika obsahuje 0,01-10 % (hmotnostních) extraktu *Pleurotus ostreatus*, který vzniká sušením *Pleurotus ostreatus* za pokojové teploty, dále mražením suchých částí kapalným dusíkem a pak rozmělněním tak, aby směs vytvořila prášek. Dispergací 5 objemových procent prášku ve vodě, 80% etanolickém roztoku či v 60% 1,3-butylen glykolu a vařením roztoku na 70-90°C po 48 hodin, na 20-50°C po 10-20 dní nebo 40-80°C 8-48 hodin a zfiltrováním 400 sítím a 0,45 µm filtračním papírem.⁴¹

Doplňky stravy obsahují kombinace β-glukanů, které jsou získávány z různých přirozených zdrojů β-glukanu.⁴²

Jedlé houby – potenciální použití v medicíně – tato studie osvětluje účinky některých dříve izolovaných a identifikovaných látek vyšších stopkovýtrusých hub, původně slibující antitumorózní, imunomodulační, dobré účinky na kardiovaskulární systém, antihypercholesterolemické, antivirové účinky (extrakt z mycelia kultury *Lentinus edodes* má silný efekt na replikaci herpes simplex viru typu 1), antibakteriální aktivitu proti rodu *Streptococcus*, rodu *Lactobacillus*, rodu *Prerorella* a rodu *Porphyromonas* a antiparazitické účinky. Léčivé houby mají dlouhou tradici užívání v lidové medicíně. Houby použitelné proti rakovině žaludku, jícnu, plic jsou známy v Číně, Rusku, Japonsku, Koreji, také v USA a Kanadě. Existuje okolo 200 druhů hub, které mají významné inhibiční účinky na růst různých typů tumorů. *Lentinus* (shiitake), *Pleurotus* (oyster), *Auricularia* (mu-er), *Flammulina* (enokitake), *Tremella* (yin-er), *Stericium* a *Grifola* (maitake) – tyto houby se liší v míře imunomodulačních účinků, účinků snižujících hladinu cholesterolu a dalších prospěšných či terapeutických vlivů na zdraví bez významné toxicity při užívání.⁴³

Použití β -(D)-glukanu izolovaného z hub *Pleurotus ostreatus* (pleuran) a *Lentinus edodes* (lentinan) ke zvýšení bioaktivity jogurtů – cílem studie bylo vyzkoušet mikrobiologickou (kvasinky, plísně, koliformní bakterie) a smyslovou (výskyt, barva, konzistence, chuť) kvalitu a také životnost bílých a ovocných jogurtů obohacených jinými přísadami 2 typů hydrogelů β -(D)-glukanu, jmenovitě pleuranu (z *Pleurotus ostreatus*) a lentinanu (z *Lentinus edodes*). Jogurty byly skladovány po 30 dní v ledničce ($5^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$). Vzorkování probíhalo 1., 15. a 30.den skladování. Výsledky získané analýzou jogurtů s přísadami pleuranu a lentinanu vykazují, že fermentační schopnost bílých a ovocných jogurtů nebyla inhibována přidáním hydrogelů před tímto procesem. Kyselost (pH) těchto vzorků vykazuje hodnoty typické pro tento druh produktu během měsíčního skladování. Zmíněné skupiny mikroorganismů (koliformní bakterie, kvasinky a plísně) se nevyskytly během celé skladovací periody (<1 CFU/g). Aplikace obou hydrogelů přidaných do jogurtů nemá žádný negativní vliv na smyslovou akceptibilitu produktů. Všechny vzorky si zachovaly velmi dobrou kvalitu během celé doby skladování a významně se nelišily jeden od druhého ve vyhodnocení individuálních parametrů.⁴

3. SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA

3.1 VOLNÉ RADIKÁLY A ANTIOXIDANTY

3.1.1 Volné radikály

Atom nebo molekula (neutrální či ion) obsahující alespoň jeden orbital s jediným, tedy nepárovým elektronem, se nazývá volný radikál. Většina biomolekul nejsou radikály, neboť obsahují orbitály plně obsazené dvěma elektrony.

Bylo získáno mnoho dokladů o tom, že v organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku a reaktivních forem dusíku. Tyto látky mají značný fyziologický i patogenetický význam. Část z nich jsou volné radikály. Jde o látky, které pohotově reagují s různými biologickými strukturami – mastnými kyselinami, lipidy, aminokyselinami, proteiny, mononukleotidy a 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 dezinformační agenti, schopní organismus poškodit a dokonce ho i usmrtit.

Volný radikál vzniká z “normálních” molekul trojím způsobem:

- homolytickým štěpením kovalentní (dvouelektronové) chemické vazby, přičemž každý fragment získá jeden nepárový elektron
- přidáním jednoho elektronu k normální molekule = redukcí
- ztrátou jednoho elektronu = oxidací

Volné radikály jsou zcela obecným metabolitem v každé buňce a každá buňka musí být vybavena prostředky, které ji před těmito reaktivními látkami chrání.

Mezi volné radikály reaktivních forem kyslíku patří: superoxid ($\bullet\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$), peroxy ($\bullet\text{ROO}$), alkoxy ($\bullet\text{RO}$), hydroxyperoxy ($\bullet\text{HO}_2$). Volné radikály reaktivních forem dusíku jsou: oxid dusnatý ($\bullet\text{NO}$), oxid dusičitý ($\bullet\text{NO}_2$).

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 vývoje biologického systému.

3.1.2 Antioxidační ochranný systém

Vzestup koncentrace kyslíku v zemské atmosféře způsobený před 2,5 miliardami let fotosyntetickou aktivitou sinic musel způsobit stres, který mohly přežít jen druhy, u nichž se vyvinuly mechanismy chránící je před vysoce reaktivním prvkem (a hlavně 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, lapače a zhášeče. Tyto pojmy nejsou založeny na chemickém principu, kterým ochranné látky působí.

Na antioxidační ochraně 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.

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 antioxidačního ochranného systému nebo kombinací obou těchto nedostatků.

3.1.3 Antioxidační terapie

Oxidační stres je nedílnou součástí řady nemocí a u některých je i primární příčinou chorobného stavu. Při řadě chorobných stavů dochází nejen k poklesu kapacity antioxidačních systémů, ale i ke zvýšené tvorbě radikálů.

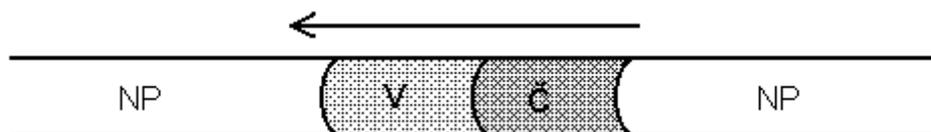
Mnoho experimentálních studií *in vitro* a *in vivo* prokazuje příznivý vliv antioxidantů v různých kombinacích a modelech. Na celém světě proběhlo a stále probíhá mnoho klinických studií s antioxidační terapií lidí. Jejich výsledky nejsou jednoznačné nejspíše proto, že oxidační stres je jen jedním z dějů probíhajících při těchto onemocněních. Úspěch antioxidační terapie závisí na stupni poznání úlohy volných kyslíkových radikálů v patogenezi dané nemoci.⁴⁵

3.2 SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA

Sekvenční injekční analýza – rychlá metoda zjištění antioxidační aktivity.

Princip a vlastnosti metody:

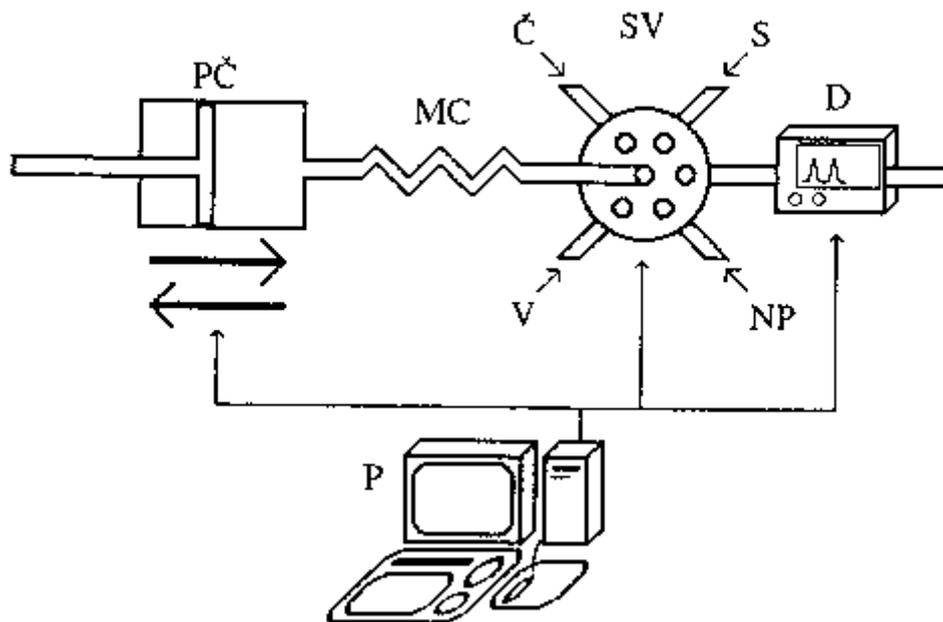
Analyt obsažený v roztoku vzorku se reakcí s činidlem převádí na detekovatelný produkt (např. barevný). Měří se vhodná analytická vlastnost produktu (např. absorbance při určité vlnové délce). Vzorek s činidlem se v toku nosného proudu vzájemně mísí a dochází k chemické reakci. V průtokovém detektoru je pak reakční produkt měřen, signál je registrován formou píků. Technika SIA pracuje s oddělenými měřicími cykly. Cyklus začíná postupným nasátím zóny nosného proudu, vzorku a činidla do jednonábového systému pomocí vícesytného selekčního ventilu a pístového čerpadla. Následně se směr pohybu pístu obrátí (obr.5), dojde k promísení zóny vzorku a činidla. Cyklus končí dopravením vzniklého produktu (obr. č. 16) do detektoru. Výsledný analytický signál má podobu píku. V podstatě se jedná o záznam koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu jeho zóny detektorem.⁴⁶



obr. č. 15: Dávkované zóny při zpětném směru toku (NP – nosný proud, V – vzorek, Č – činidlo)⁴⁶



obr. č. 16: Vytlačování jednotlivých zón, včetně vznikající zóny produktu, do detektoru (NP – nosný proud, V – vzorek, P – produkt, Č – činidlo)⁴⁶



Obr. č. 17: Schéma běžné SIA sestavy (PČ – pístové čerpadlo, SV – selekční ventil, S – standard, Č – činidlo, NP – nosný proud, V – vzorek, MC – mísící cívka, D – detektor, P – počítač) ⁴⁶

Systém SIA pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů pístu čerpadla, které jsou synchronizovány s přepínáním pozic selekčního ventilu. Nutnou podmínkou k dosažení reprodukovatelné disperze jednotlivých zón v SIA systému, a tím také k získání reprodukovatelného koncentračního gradientu reakčního produktu (resp. odpovědi detektoru), je přesná synchronizace a opakovatelnost těchto kroků. Nezbytnou součástí systému SIA je tedy vhodný mikroprocesor (nejlépe PC) s příslušným programovým vybavením. PC současně řídí kroky měřicího cyklu a současně sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data. Doby trvání jednoho měřicího cyklu bývá asi 30 sekund. Průtoková rychlost je přibližně 1 ml/min. ⁴⁶

3.2.1 Stanovení antioxidační aktivity

Jako primární antioxidanty označujeme látky, které zpomalují oxidační proces inaktivací volných radikálů, nebo tzv. vychytávače či zametače (scavengers), lapače (trappers) a zhášecí (quencher). Tyto pojmy nejsou založeny na chemickém principu, kterým ochranné látky působí, tak je vymezení jejich obsahu problematické. ⁴⁵

Radikály reaktivních forem kyslíku ($\bullet\text{ROO}$, $\bullet\text{HO}$, $\bullet\text{RO}$, $\bullet\text{O}_2^-$) jsou velmi reaktivní sloučeniny značně rozdílné životnosti a chemických vlastností, jejich přímá detekce je

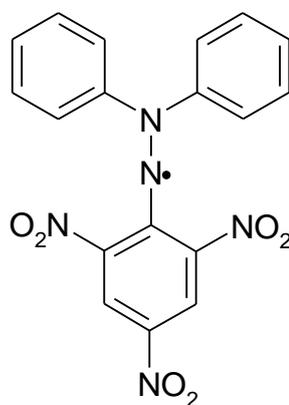
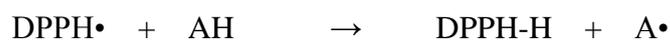
tedy nesnadná. K určení celkové antioxidační aktivity se proto častěji užívají stabilní radikálové sloučeniny. Antioxidační aktivita může být určena v modelových systémech. Jako modelové oxidační systémy jsou k určení antioxidační aktivity alternativně využívány tyto:

- inhibice chemiluminiscence luminolu (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindion)
- inhibice chemiluminiscence tetralinu (1,2,3,4-tetrahydronaftalen)
- peroxidace methyl linoleátu
- odbarvení β -karotenu
- odbarvení ABTS⁺ radikálu (2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kys.))
- inhibice tvorby thiokyanátu železitého
- odbarvení DPPH radikálu (2,2-difenyl-1,1-pikrylhydrazyl)

Tyto modelové oxidační systémy umožňují snadný screening a porovnání primárních antioxidantů. Testy tohoto typu jsou vhodné pro určení celkového antioxidačního účinku vzorku.⁴⁷

3.2.2 Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu

Stanovení antioxidační aktivity sloučeniny či extraktů umožňuje reakce se stabilním radikálem (DPPH). Jedná se o velmi stabilní radikál, který může být inaktivován, jen antioxidantem (AH), který je donorem atomu vodíku. Redukce DPPH je charakterizována poklesem absorbance při dané vlnové délce. Absorpční maximum pro DPPH je při $\lambda=525$ nm.⁴⁸



DPPH radikál

Je třeba počítat s tím, že k inaktivaci DPPH radikálu dochází také vlivem světla a působením singletového kyslíku.⁴⁹

Reakce probíhá ve vodně-organickém (50% ethanolu) i v organickém (benzen, dioxin, methanol, ethanol) prostředí. Reakce probíhá nejlépe bez přídavku pufrů.

Doporučované koncentrace DPPH se pohybují v rozmezí $1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$, v závislosti na použitých objemech činidla a vzorku a charakteru sledovaného vzorku.

Antioxidační účinek se vyjadřuje v % poklesu absorbance oproti slepému vzorku.⁴⁸

IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

1. POMŮCKY

1.1 ROZPOUŠTĚDLA

aceton č.

diethylether p.a.

ethanol čistý (s 5 % methanolu)

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

anilin č.

anthron č.

anisaldehyd p. a.

berberinsulfátové činidlo

bromkresolová zeleň č.

2,6-dibromchinonchlorimid č.

difenylamin č.

2,2 - difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH)

2,4 -dinitrofenylhydrazin

dusičnan bizmutitý zásaditý p. a.

dusičnan měďnatý p. a.

dusitan sodný p. a.

Fast Blue B salt p. a.

D-glukóza č.

fosfomolybdenová kyselina č.

hexakynoželezitan draselný č.
hydroxid draselný č.
hydroxid sodný č.
hydroxylaminhydrochlorid p. a.
chlorid manganatý tetrahydrát p. a.
chlorid železitý
isatin č.
jodid draselný č.
2,4,6-kolidin p. a.
křemelina - celit Hyflosupercell (John Manville) č.
kyselina chloristá 70% p. a.
kyselina chlorovodíková 35 %
kyseliny octová 98% p. a.
kyselina fosforečná 85% p. a.
kyselina mravenčí 85% p. a.
kyselina sírová 96% p. a.
kyselina sulfanilová p. a.
kyselina vinná č.
1,2-naftochinon-4-sulfonová kyselina p. a.
ninhydrin p. a.
octan zinečnatý č.
peroxid vodíku 3%
uhličitan sodný č.
trolox č. (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina)
vanilin p.a.

1.3 PŘÍSTROJE

horkovzdušná sušárna HS 31 A, UV lampa Camag 254/366 nm, FIALabTM,
ALITEA[®] USA

2. PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ

2.1 POUŽITÝ MATERIÁL

Plodnice vybraných taxonů hub byly klasifikovány Východočeskou mykologickou společností (Dr. Věra Samková). Poté byly zmrazeny tekutým dusíkem a do doby zpracování byly uchovávány v plastických kontejnerech v atmosféře dusíku při $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$.⁵⁰

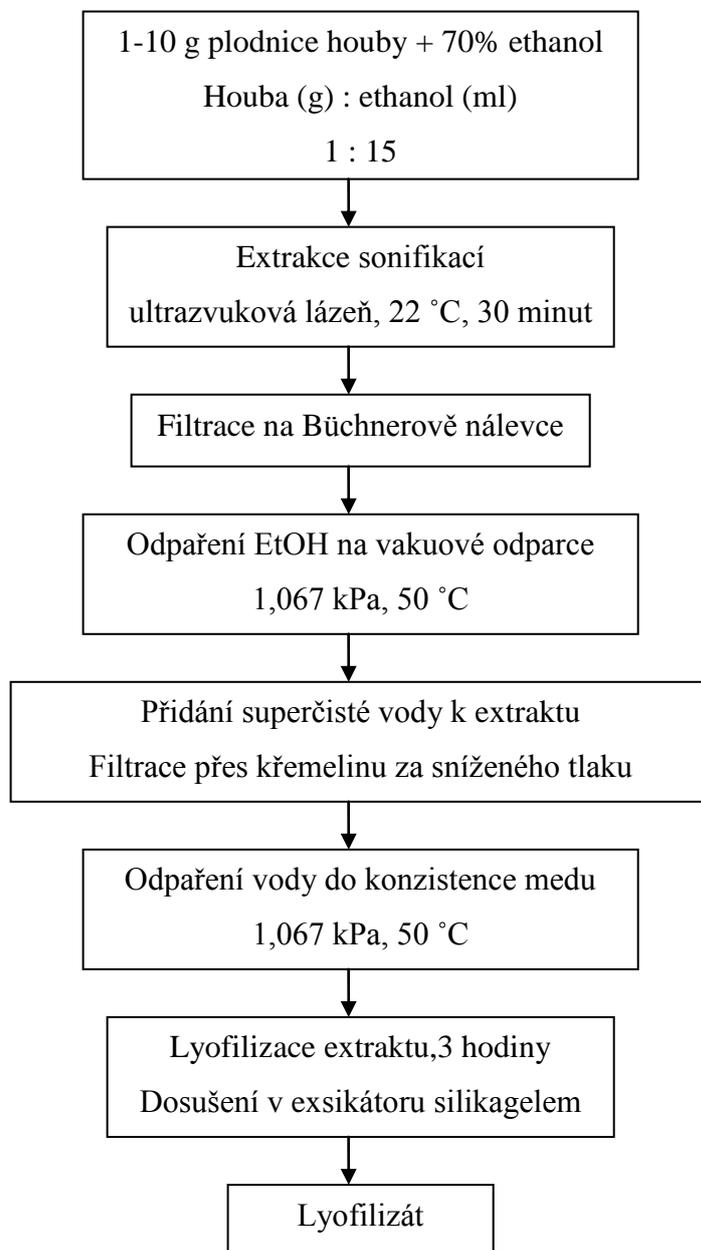
Tab. č.1

| Číslo | Označení | Naleziště hub | Nálezce |
|-------|----------|---------------------------------|------------|
| 1. | F052-03 | neznámé | neznámý |
| 2. | F068-03 | neznámé | neznámý |
| 3. | F091-03 | neznámé | neznámý |
| 4. | F197-02 | Hradec Králové, zahrada | Novotný |
| 5. | F095-01 | neznámé | neznámý |
| 6. | F046-03 | neznámé | neznámý |
| 7. | F039-03 | neznámé | neznámý |
| 8. | F083-03 | neznámé | neznámý |
| 9. | F214-02 | Černilov, les Čibr | V. Samková |
| 10. | F003-03 | Černilov, les Kaltouz | Šolc |
| 11. | F013-01 | Choťovice, NPR - Žehuňská obora | V. Samková |
| 12. | F064-01 | Račín, les východně od vsi | M. Macek |
| 13. | F176-02 | Pardubice | J. Sigl |
| 14. | F146-01 | Černilov, hřbitov | V. Samková |

2.2 POSTUP PŘÍPRAVY LYOFILIZÁTU

Do baňky se navázilo 5 g houby k tomu se přidá ethanol podle hmotnosti houby. Baňka se umístila na 30 minut do ultrazvukové lázně. Potom se extrakt odfiltraval od pevného podílu na Büchnerové nálevce. Poté se ještě promyl 70% ethanolem. Následovalo odpaření na vakuové odparce. Po odpaření ethanolu vakuovou odparkou, se přistoupilo k další filtraci. Tentokrát se použila vata a křemelina. Nakonec se ještě odpařuje na vakuové odparce, až do konzistence medu. Dalším krokem je lyofilizace a dosušení silikagelem.⁵⁰

2.3 SCHÉMA PŘÍPRAVY LYOFILIZÁTU (obr. č. 18)



3. DETEKČNÍ ČINIDLA PRO TENKOVrstvou CHROMATOGRAPHII

D1: UV $\lambda = 254$ nm

Chromatogram byl po vysušení pozorován pod UV lampou při $\lambda = 254$ nm. Pozitivní reakce se projevuje vznikem různě tmavých skvrn, ve kterých je zhasen fluoreskující luminoфор vrstvy chromatogramu.⁵¹

D2: UV $\lambda = 366$ nm

Chromatogram byl pozorován pod UV lampou při $\lambda = 366$ nm. Pozitivní reakce se projevuje vznikem fluoreskujících skvrn.⁵¹

D3: Acetanhydrid - kyselina sírová (Liebermann-Burchardovo činidlo)

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 po postřiku zahříván při teplotě 100 °C asi 7 minut a vyhodnocen pod UV světlem $\lambda = 366$ nm. Při pozitivní reakci vznikají fluoreskující skvrny.⁵¹

D4: Anisaldehyd - kyselina sírová

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.⁵²

D5: 2,6-Dibromchinonchlorimid (Gibbsovo činidlo)

Po postřiku čerstvě připraveným 0,4% methanolvým roztokem 2,6-dibromchinonchlorimidu byl chromatogram postřikán 10% vodným roztokem uhličitanu sodného. Fenolické sloučeniny tvoří s činidlem hnědé skvrny.⁵²

D6: Difenylamin - anilin - kyselina fosforečná

1 g anilinu a 1 g difenylaminu byl rozpuštěn 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.⁵²

D7: Dragendorffovo činidlo podle Muniera

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 uchováván 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.⁵¹

D8: Fast Blue B salt

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

Postřikovací roztok II.: 0,1 mol.l⁻¹ NaOH

Chromatogram byl nejprve postříkán postřikovacím roztokem I., po uschnutí byl postříkán postřikovacím roztokem II. Vznikaly různě zbarvené skvrny.⁵²

D9: Glukóza - anilin (Schweppovo činidlo)

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. Chromatogramem byl zahříván po 10 minut na 115 °C. Vznikají červené až hnědé skvrny.⁵¹

D10: Hexakynoželezitan draselný - chlorid železitý

2% roztok chloridu železitého byl smíchán s 1% roztokem hexakynoželezitanu draselného (1:1). Činidlo je stálé nejdéle 5 minut. Vznikají modré, resp. zelené skvrny.⁵¹

D11: Hydroxylamin - chlorid železitý

Roztok A: byl připraven rozpuštěním 20 g chloridu hydroxylamina 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 35% 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, převážně fialové.⁵¹

D12: Isatin - octan zinečnatý

Isatin (1g) a octan zinečnatý (1,5g) byly rozpuštěny ve 100 ml 95% isopropylalkoholu za tepla do 80 °C. 1 ml kyseliny octové byl přidán po ochlazení. Chromatogram byl ponechán asi 20 hodin při pokojové teplotě a byl pozorován. Při pozitivní reakci byly pozorovány růžové až červené skvrny.⁵¹

D13: 1,2-Naftochinon-4-sulfonová kyselina - kyselina chloristá

0,1 g 1,2-naftochinon-4-sulfonové kyseliny bylo rozpuštěno ve 100 ml směsi (20 ml ethanolu + 10 ml 60% kyselina chloristé + 1 ml formaldehydu + 9 ml destilované vody). Po postřiku činidlem byl chromatogram zahříván na 70 - 80 °C a byly pozorovány různě barevné skvrny.⁵²

D14: Ninhydrin - kolidin

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.⁵¹

D15: Paulyho činidlo (diazotovaná kyselina sulfanilová)

4,5 g kyseliny sulfanilové bylo za tepla rozpuštěno ve 45 ml kyseliny chlorovodíkové (12 mol/l) a zředěno vodou na 500 ml. 10 ml tohoto roztoku bylo ochlazen v chladničce, a pak k němu bylo přidáno 10 ml ochlazeného vodného roztoku dusitanu sodného. Získaný roztok byl ponechán 15 minut v chladničce. Bezprostředně před použitím byl smíchán s 20 ml 10% vodného roztoku uhličitanu sodného. Pozitivně reagující látky tvoří s činidlem žluté skvrny.⁵¹

D16: Vanilin - kyselina sírová

3 g vanilinu byly rozpuštěny ve 100 ml ethanolu a do roztoku byly přidány 3 ml koncentrované kyseliny sírové. Chromatogram byl zahříván na 110 °C. Vznikají různé barevné skvrny.⁵¹

D17: Peroxid vodíku

Byl připraven 3% roztok peroxidu vodíku a tímto roztokem byl postříkán chromatogram. Poté ho dáme pod UV lampu do té doby, než modrá fluorescence skvrn dosáhne maxima.⁵¹

D18: Anthron

0,3 g anthronu se rozpustilo v 10 ml kyseliny octové a 20 ml ethanolu, přidaly se 3 ml 85% kyseliny fosforečné a 1 ml vody. Po postřiku se nechal zahřát na 5-6 minut při 110 °C. Ketózy a oligosacharidy se projeví jako žluté skvrny.⁵²

D19: Bromkresolová zeleň

0,04 g bromkresolové zeleně se navázilo do 100 ml ethanolu. K tomuto roztoku se přidal 0,1 mol.l⁻¹ roztok NaOH do změny zbarvení. Provádělo se pouze u soustavy s propanolem. Skvrny byly modré.⁵¹

D20: Chlorid železitý

Připravil se 1-5% roztok chloridu železitého v 0,5 mol.l⁻¹ HCl. Hydroxamové kyseliny se jeví jako červené skvrny, fenoly byly modré nebo zelené.⁵¹

D21: Berberinové činidlo

Rozpustí se 10 mg berberinsulfátu ve 100 ml ethanolu. Pod UV lampou se objevují zóny světle žluté fluorescence na světle žlutém podkladu.⁵²

D22: Fosfomolybdenová kyselina

Činidlo A: 5% ethanolový roztok kyseliny fosfomolybdenové. Chromatogram se zahřívá na 120 °C dokud nedošlo k výraznějšímu zbarvení skvrn.⁵²

D23: 4-aminoantipyrin

I. 2% ethanolový roztok 4-aminoantipyrinu

II. 8% vodný roztok ferrikyanátu draselného.

Po postříknutí oběma činidly byl chromatogram umístěn do komory sycené 25% NH₃.

Vznikající skvrny byly lososově růžové až červenooranžové.⁵²

D24: 2,4-dinitrofenylhydrazin

Do roztoku vzniklého rozpuštěním 1 g 2,4-dinitrofenylhydrazinu ve 100 ml ethanolu, se přidalo 10 ml 36% HCl. Substance obsahující aldehydové či ketonické skupiny dávají žluté či oranžovožluté skvrny.⁵²

4. SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA

4.1 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY DPPH TESTEM POMOCÍ SIA

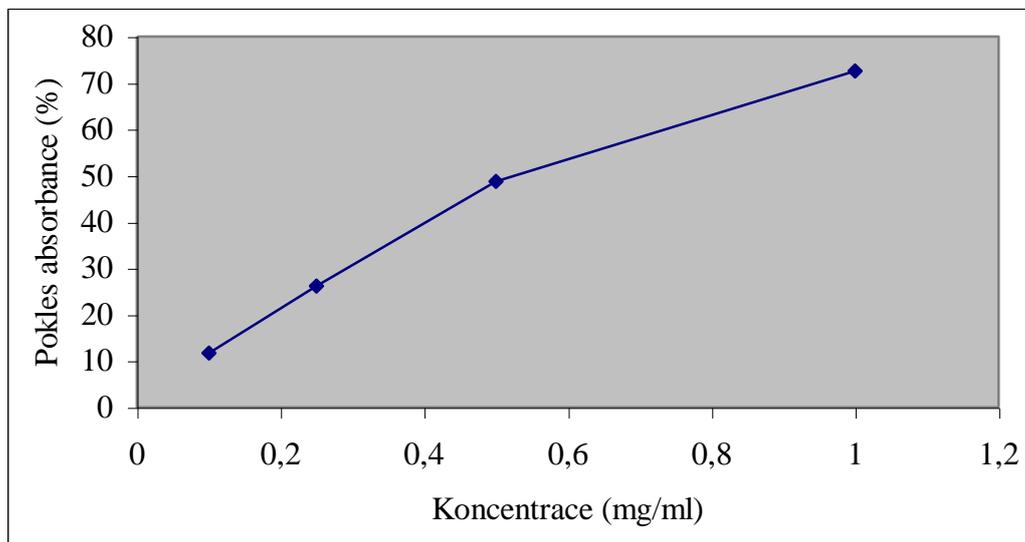
3,9 mg DPPH radikálu bylo rozpuštěno v 60 ml 96% ethanolu a doplněno vodou na 100 ml. Takto byl připraven roztok DPPH radikálu v 50% ethanolu. Roztok byl zbaven bublinek sonifikací v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut. Roztok DPPH se připraví čerstvý, tedy v den měření. Ethanol 50% slouží jako slepý vzorek a v systému SIA jako nosný proud. Roztok měřeného vzorku byl připraven rozpuštěním lyofilizátu v 50% ethanolu s konečnou koncentrací 1 mg/ml. Postupným ředěním byly připraveny tři další koncentrace vzorku 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml a 0,1 mg/ml. Všechny připravené roztoky byly odvzdušněny v ultrazvukové lázni. Po nasátí roztoku DPPH (30 μ l) přístrojem FIALabTM, ALITEA[®] USA mezi dvě zóny měřeného vzorku (po 25 μ l), resp. slepému vzorku, došlo k reakci. Po 30 vteřinách 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 zaznamenány do tabulek a vyhodnoceny graficky.

4.2 HODNOTY NAMĚŘENÝCH ANTIOXIDAČNÍCH AKTIVIT U SLEDOVANÝCH TAXONŮ

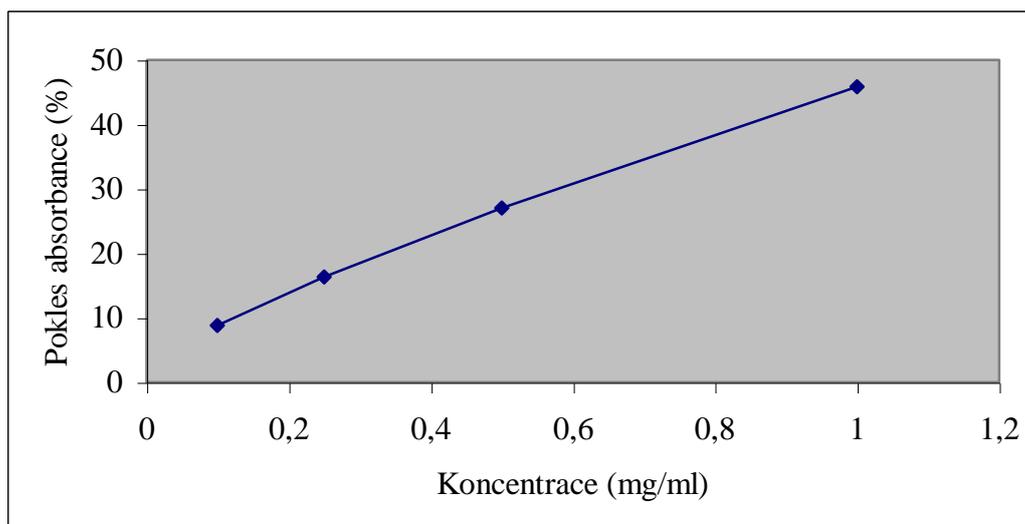
Tab. č.4 *Agaricus vaporarius*

| | | | | |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| Koncentrace (mg/ml) | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| Pokles absorbance (%) | 11,747 | 26,140 | 48,747 | 72,527 |



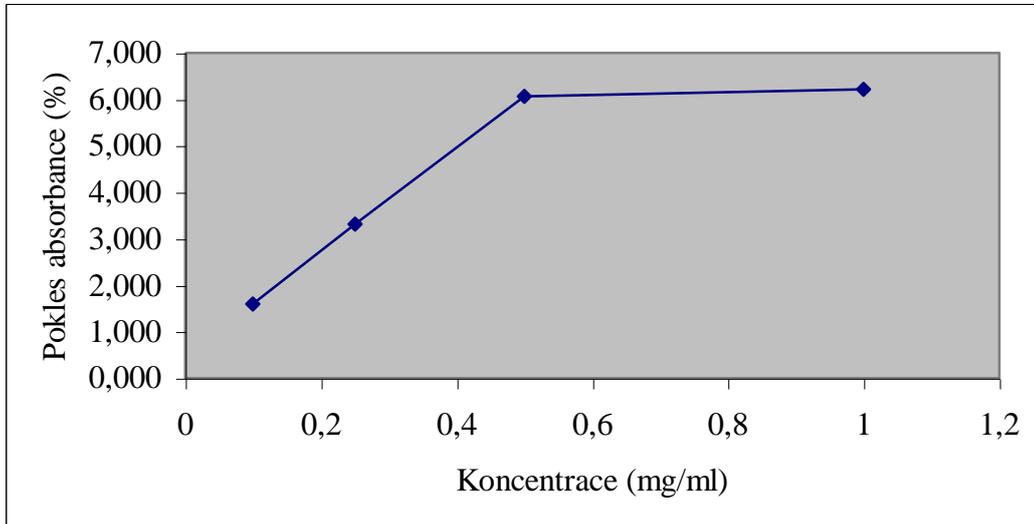
Tab. č.5 *Macrolepiota bohemica*

| | | | | |
|-----------------------|-------|--------|--------|--------|
| Koncentrace (mg/ml) | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| Pokles absorbance (%) | 8,847 | 16,367 | 27,017 | 45,860 |



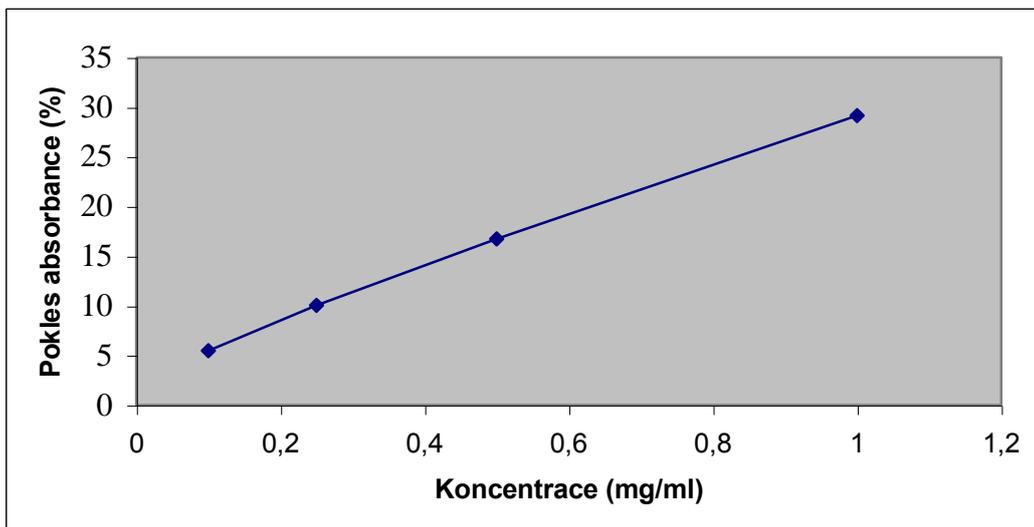
Tab. č.6 *Clavariadelphus pistillaris*

| | | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| Koncentrace (mg/ml) | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| Pokles absorbance (%) | 1,590 | 3,310 | 6,070 | 6,213 |



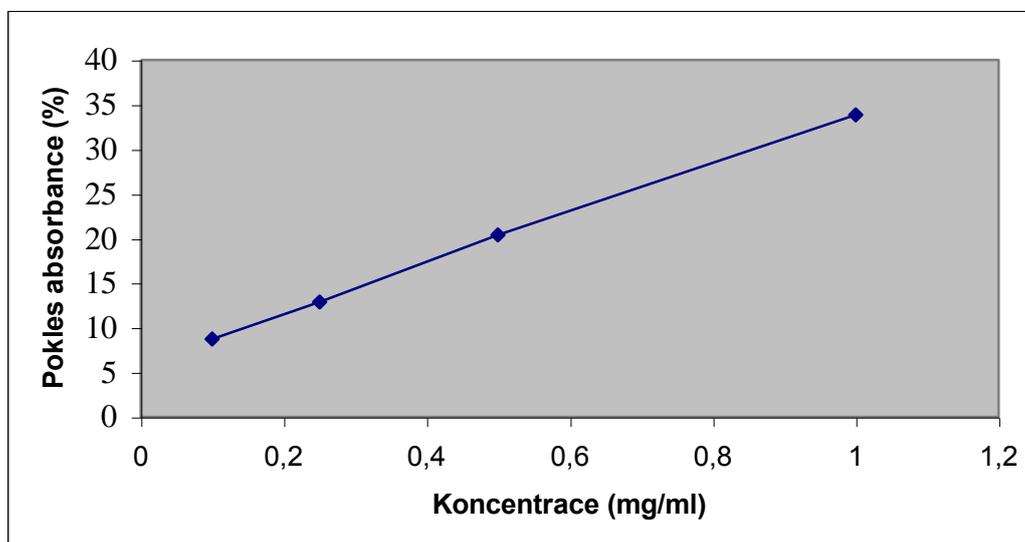
Tab. č.7 *Cortinarius anomalus*

| | | | | |
|-----------------------|------|--------|--------|--------|
| Koncentrace (mg/ml) | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| Pokles absorbance (%) | 5,46 | 10,033 | 16,727 | 29,133 |



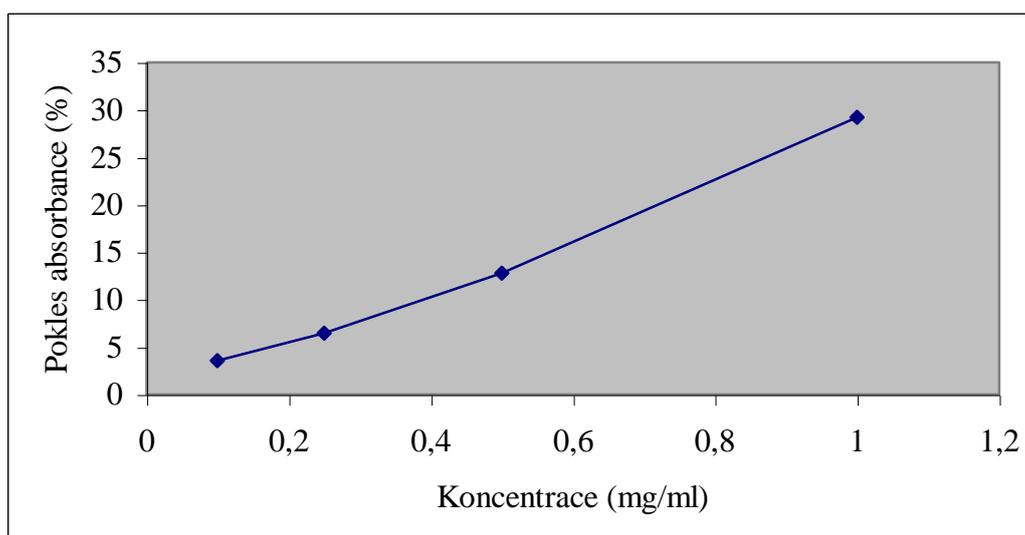
Tab. č.8 *Hebeloma sinapizans*

| | | | | |
|-----------------------|-------|--------|--------|--------|
| Koncentrace (mg/ml) | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| Pokles absorbance (%) | 8,733 | 12,887 | 20,383 | 33,823 |



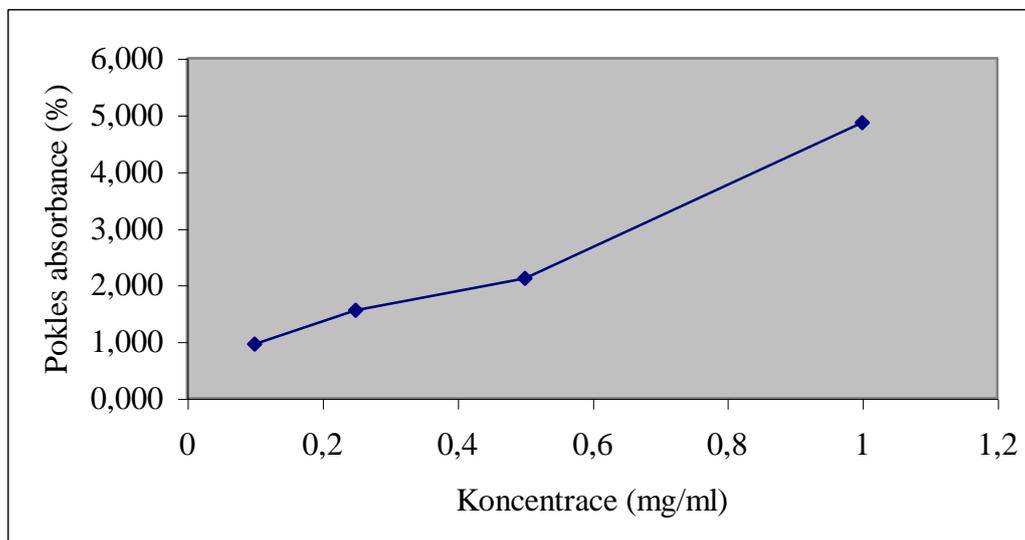
Tab. č.9 *Pholiota alnicola*

| | | | | |
|-----------------------|-------|-------|--------|--------|
| Koncentrace (mg/ml) | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| Pokles absorbance (%) | 3,573 | 6,483 | 12,810 | 29,207 |



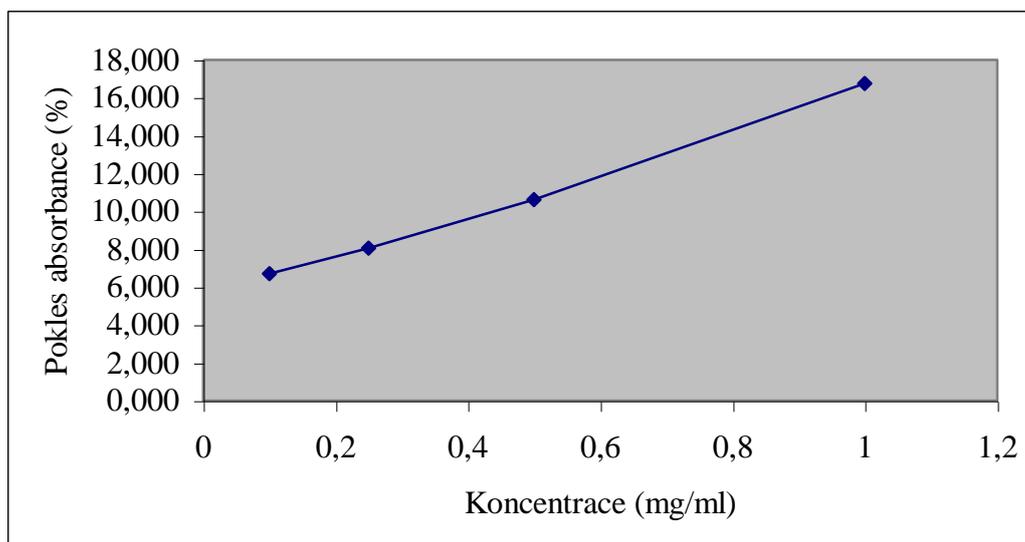
Tab. č.10 *Clitopilus prunulus*

| | | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| Koncentrace (mg/ml) | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| Pokles absorbance (%) | 0,960 | 1,550 | 2,117 | 4,860 |



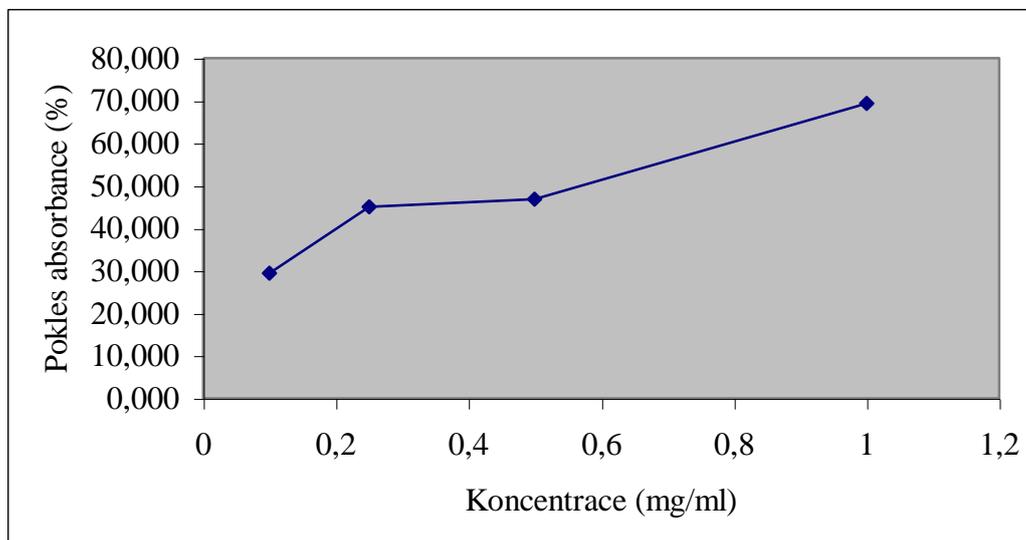
Tab. č.11 *Entoloma clypeatum*

| | | | | |
|-----------------------|-------|-------|--------|--------|
| Koncentrace (mg/ml) | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| Pokles absorbance (%) | 6,710 | 8,073 | 10,630 | 16,757 |



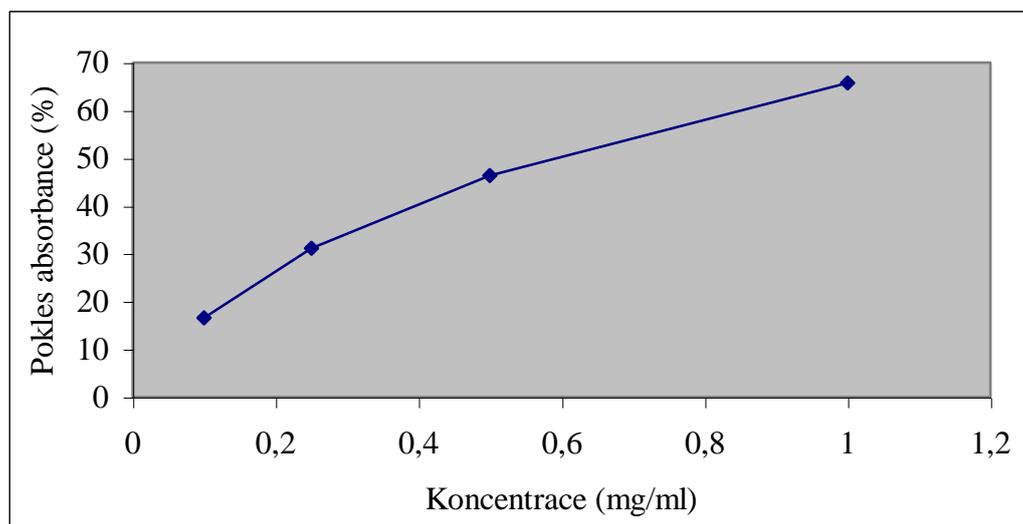
Tab. č.12 *Paxillus involutus*

| | | | | |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| Koncentrace (mg/ml) | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| Pokles absorbance (%) | 29,480 | 45,070 | 46,840 | 69,410 |



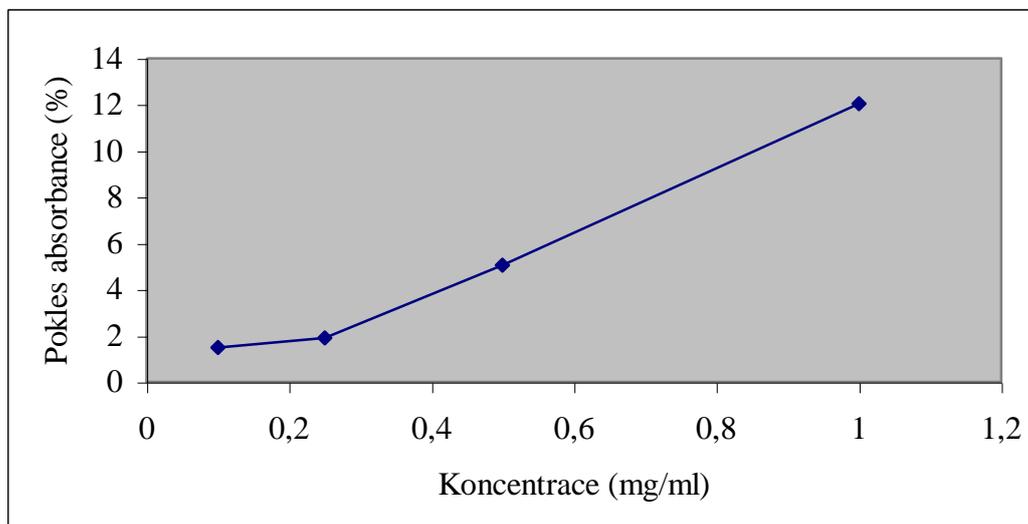
Tab. č.13 *Paxillus rubicundulus*

| | | | | |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| Koncentrace (mg/ml) | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| Pokles absorbance (%) | 16,603 | 31,100 | 46,397 | 65,727 |



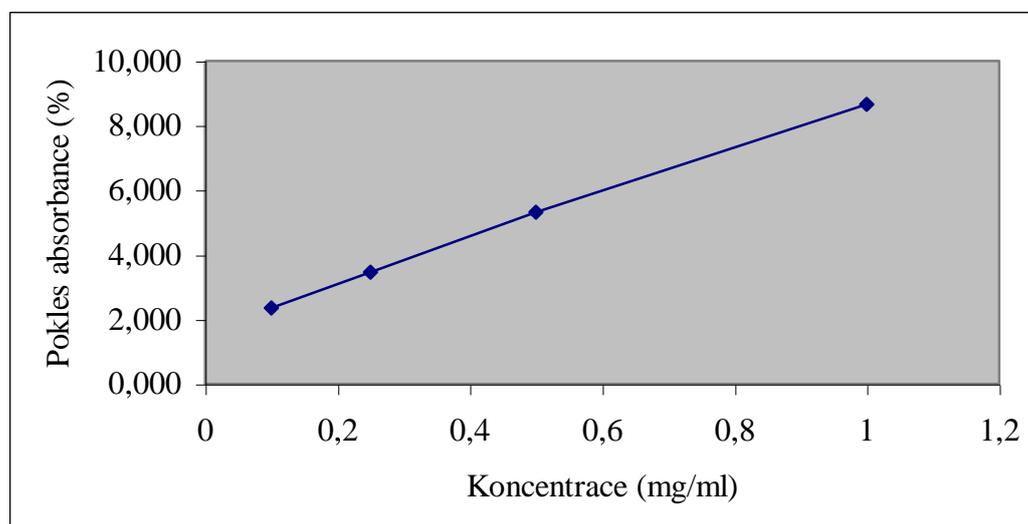
Tab. č.14 *Pleurotus dryinus*

| | | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|--------|
| Koncentrace (mg/ml) | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| Pokles absorbance (%) | 1,487 | 1,897 | 5,063 | 12,050 |



Tab. č.15 *Pleurotus ostreatus*

| | | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| Koncentrace (mg/ml) | 0,1 | 0,25 | 0,5 | 1,0 |
| Pokles absorbance (%) | 2,360 | 3,460 | 5,320 | 8,653 |



5. HODNOCENÍ EXTRAKTŮ

5.1 HODNOCENÍ EXTRAKTŮ TENKOVRSŤVOU CHROMATOGRÁFIÍ

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna vzestupným způsobem v chromatografických komorách sycených minimálně 60 min parami elučních soustav.

Adsorbent: Kieselgelplatten Merck[®], desky 100 x 150 mm

Silufol[®] s indikátorem UV $\lambda = 254$ nm, desky 100 x 150 mm

Silufol[®] bez indikátoru, desky 100 x 150 mm

Dráha: 80 mm

Vyvíjení: 1x

Detekce: D1-D24

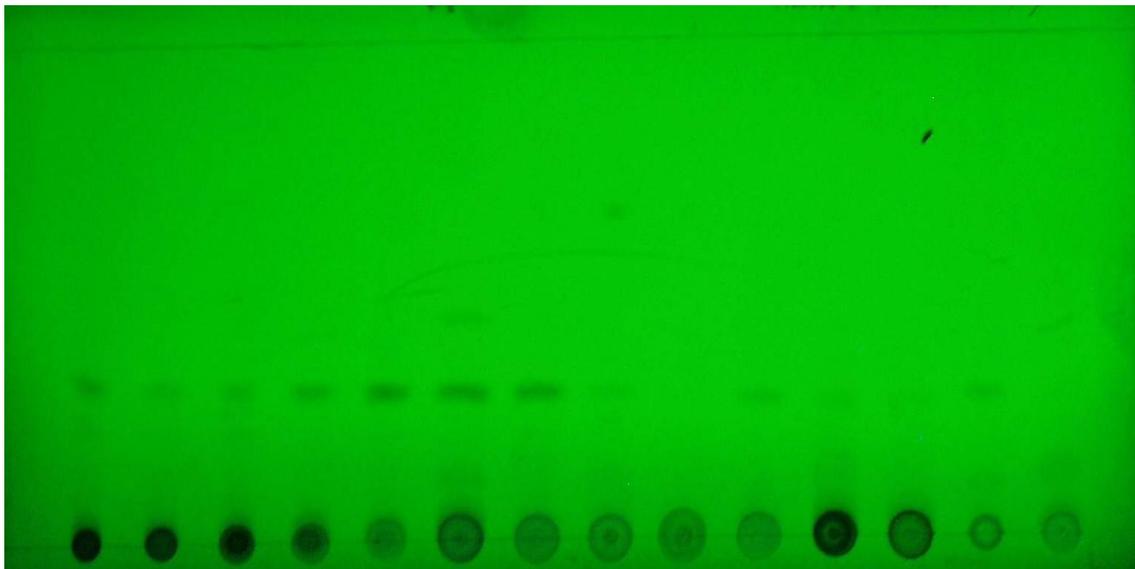
Soustavy: S1: toluen + ethylformiát + kyselina mravenčí

50 40 10

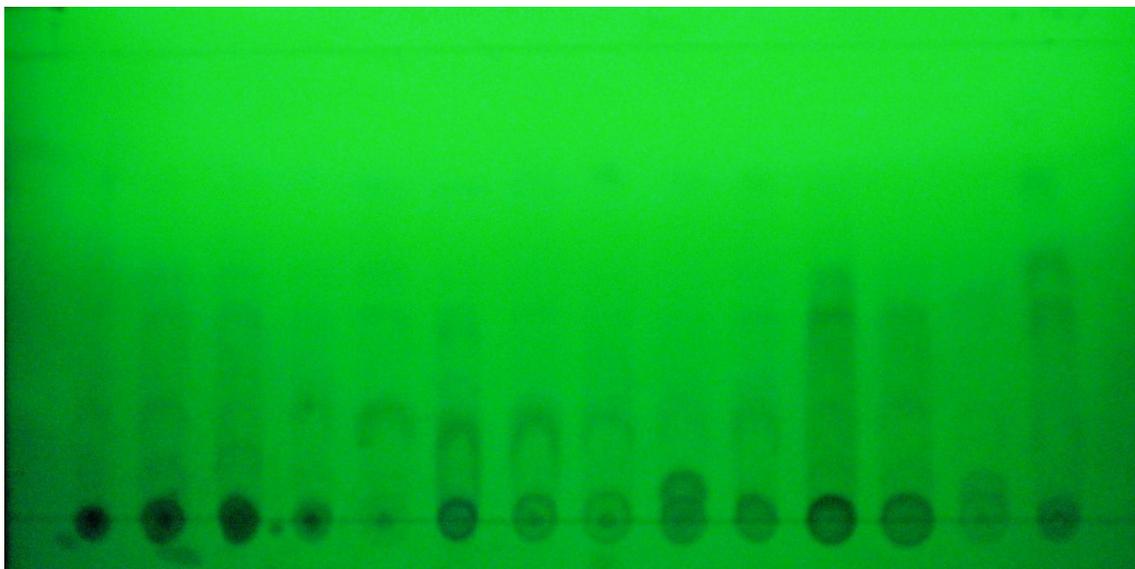
S2: propanol + voda

90 10

Detekce pod UV = 254 nm

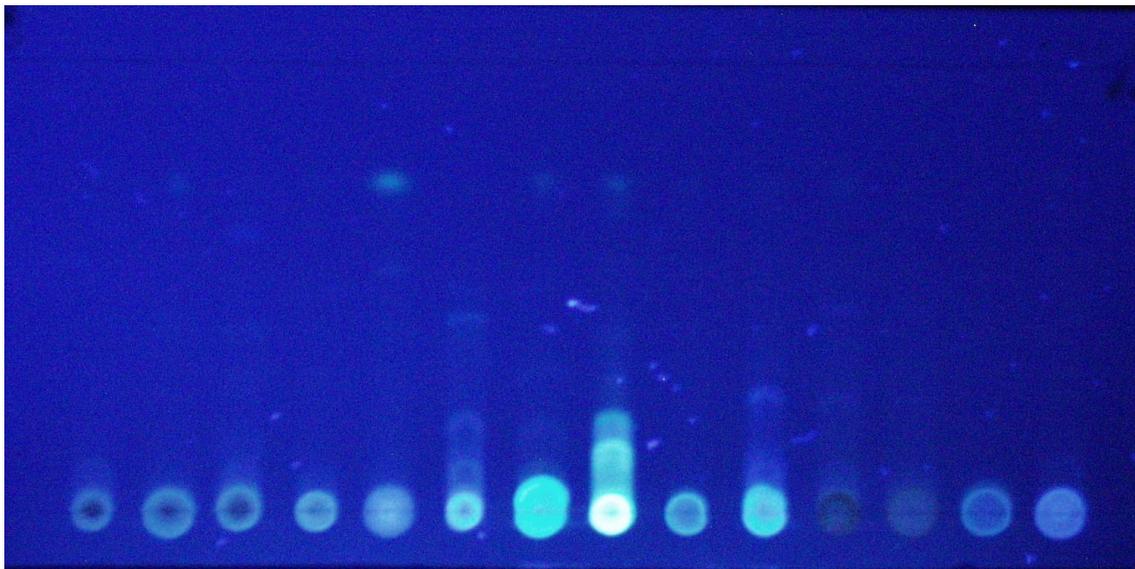


obr. č. 19

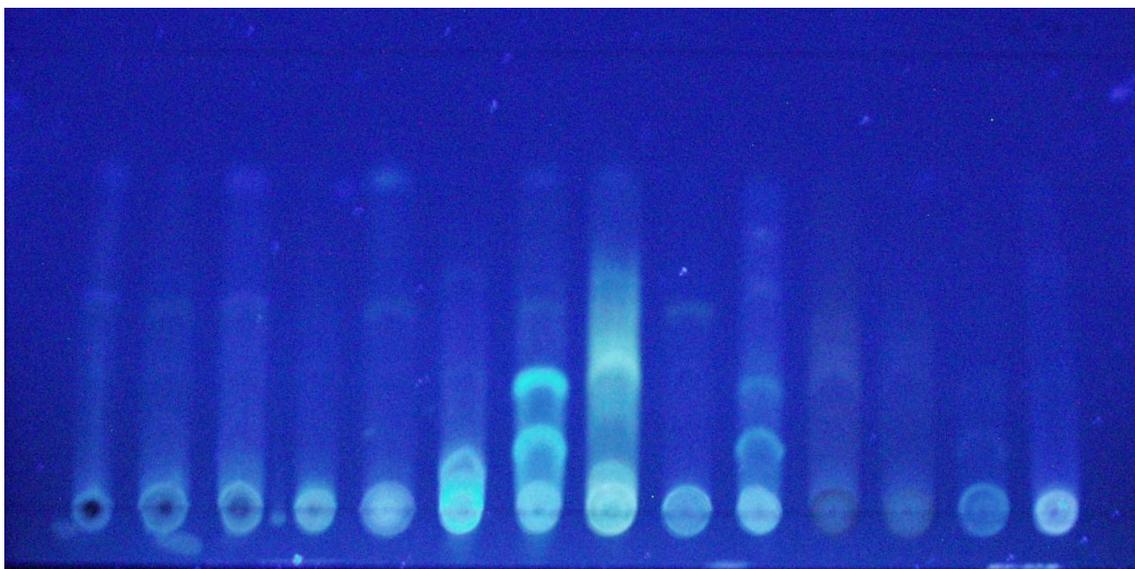


obr. č. 20

Detekce pod UV = 366 nm

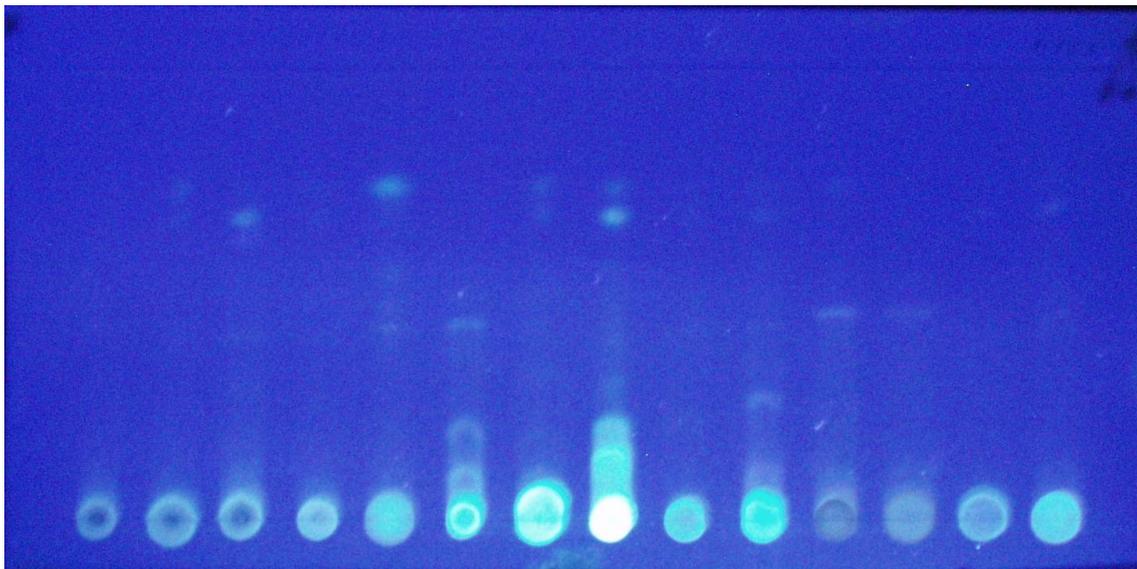


obr. č. 21

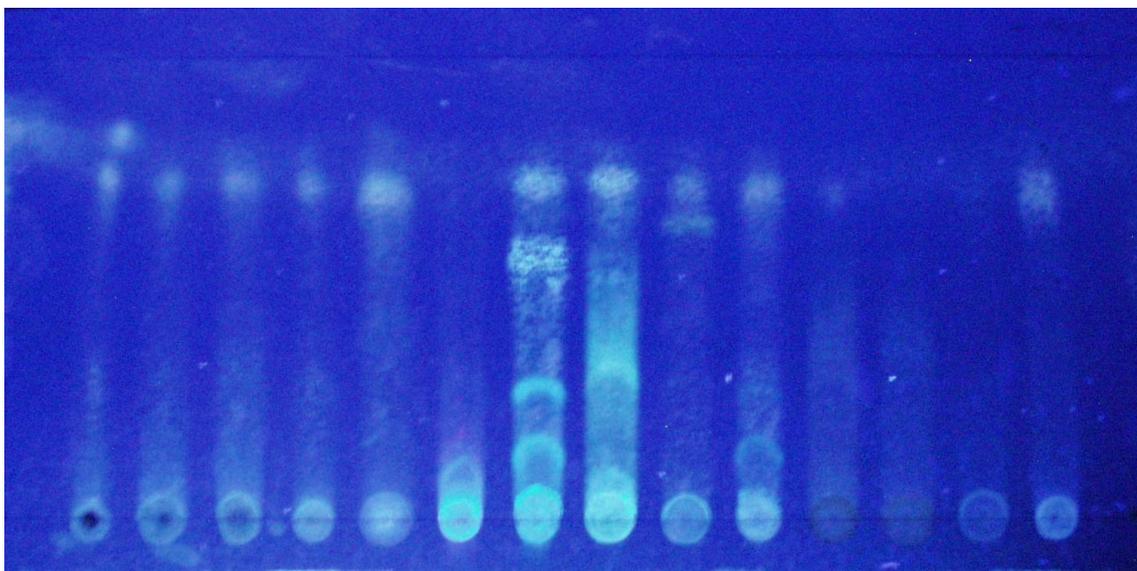


obr. č. 22

Detekce na sterolů, steroidů a triterpenů

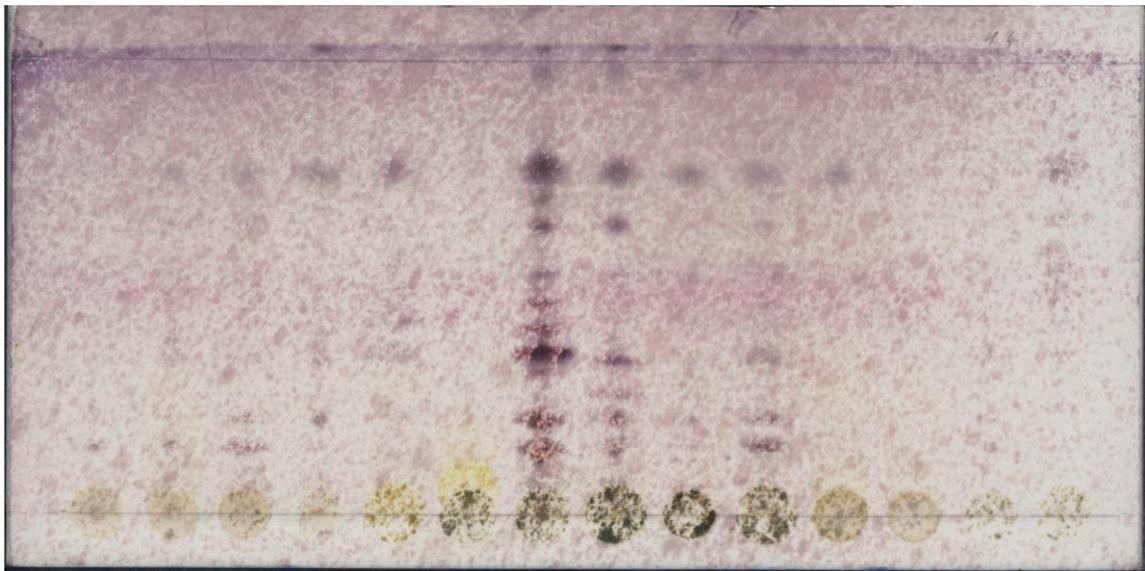


obr. č. 23

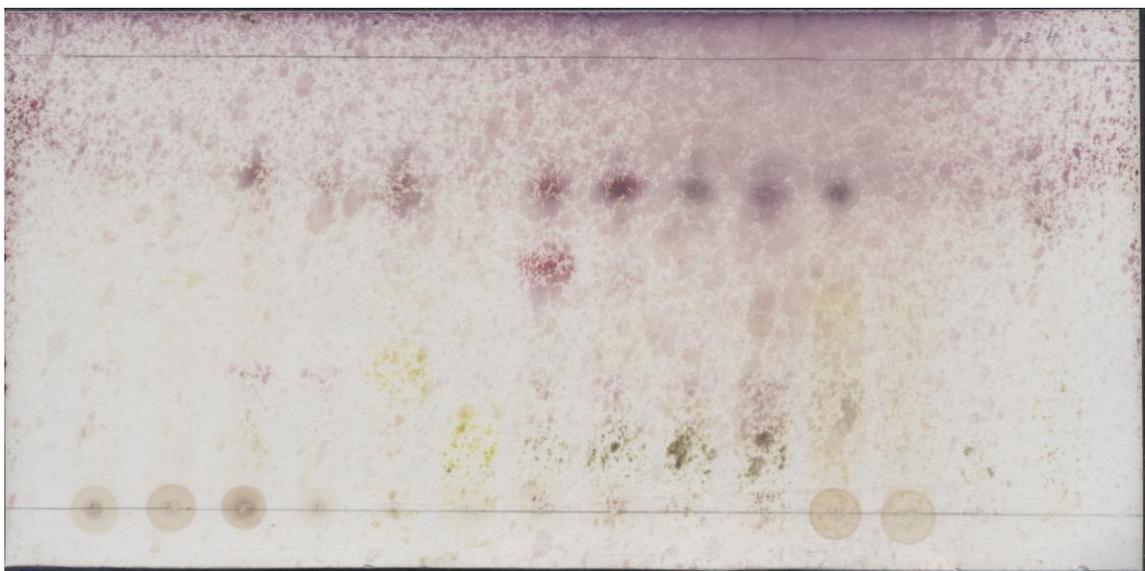


obr. č. 24

Detekce sacharidů



obr. č. 25



obr. č. 26

Detekce fenolů



obr. č. 27



obr. č. 28

Detekce sacharidů

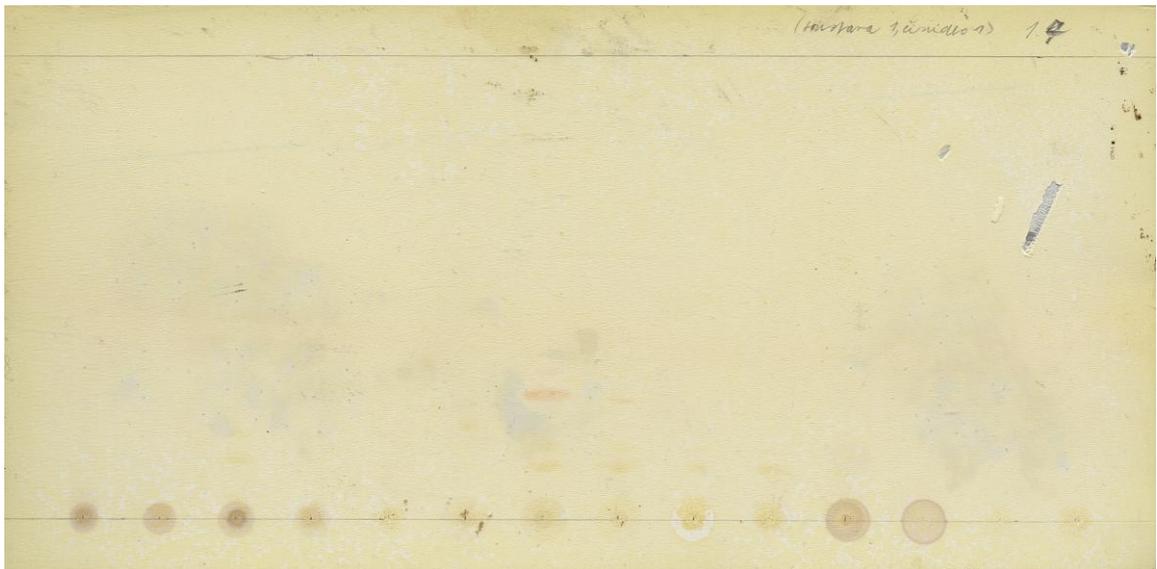


obr. č. 29



obr. č. 30

Detekce alkaloidů



obr. č. 31



obr. č. 32

Detekce fenolů, aminů



obr. č. 33



obr. č. 34

Detekce karboxylových kyselin



obr. č. 35



obr. č. 36

Detekce redukujících sloučenin (fenoly...)



obr. č. 37

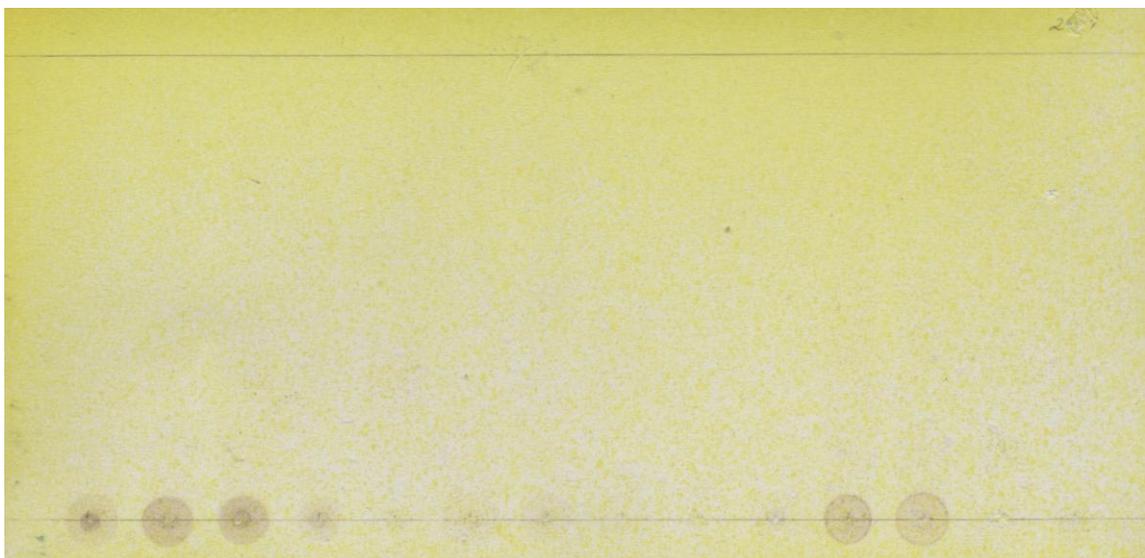


obr. č. 38

Detekce laktonů

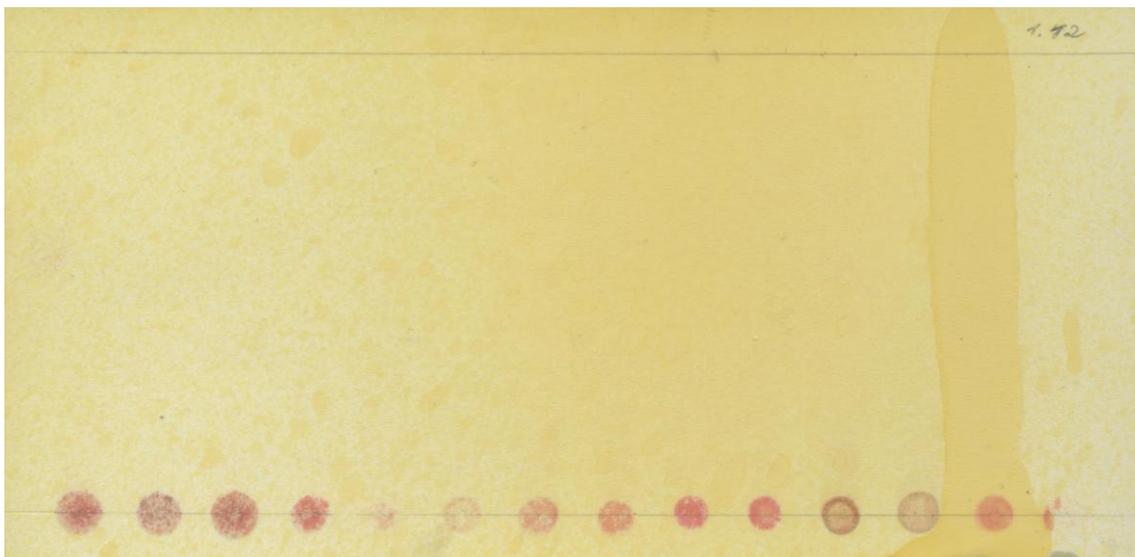


obr. č. 39



obr. č. 40

Detekce aminokyselin

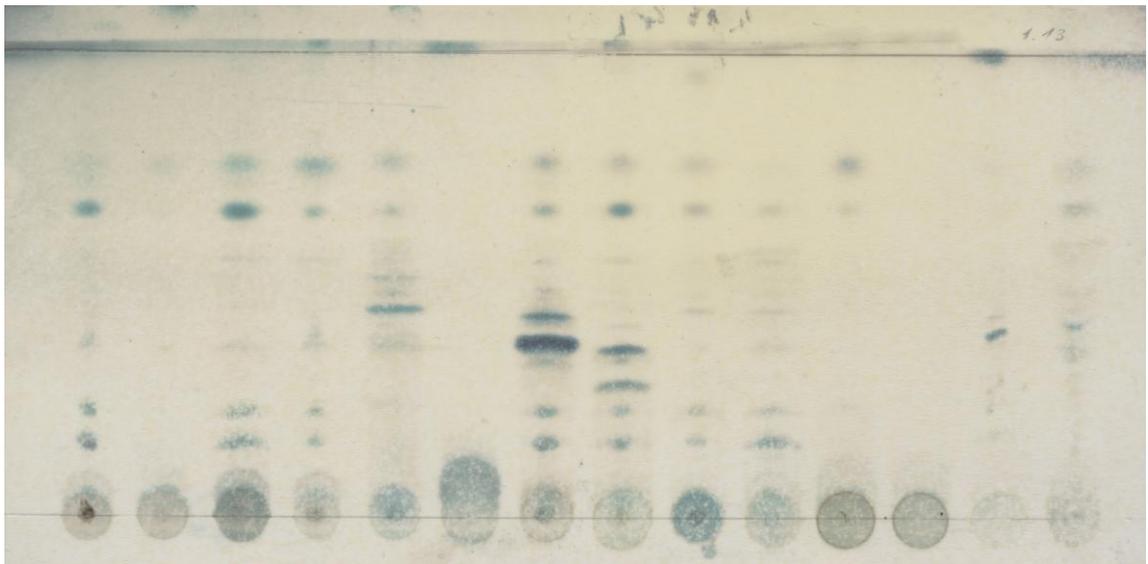


obr. č. 41

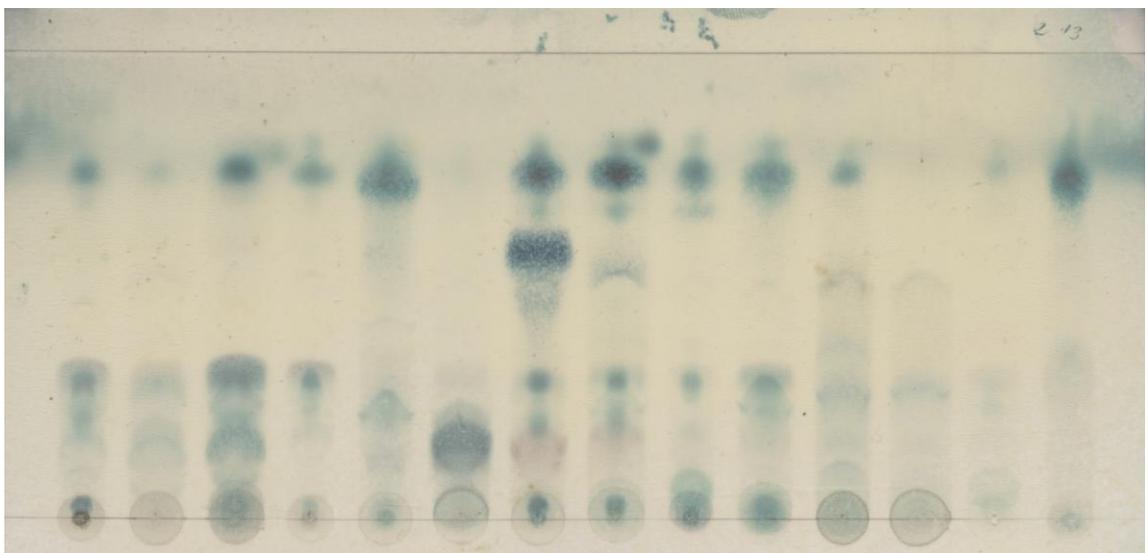


obr. č. 42

Detekce sterolů

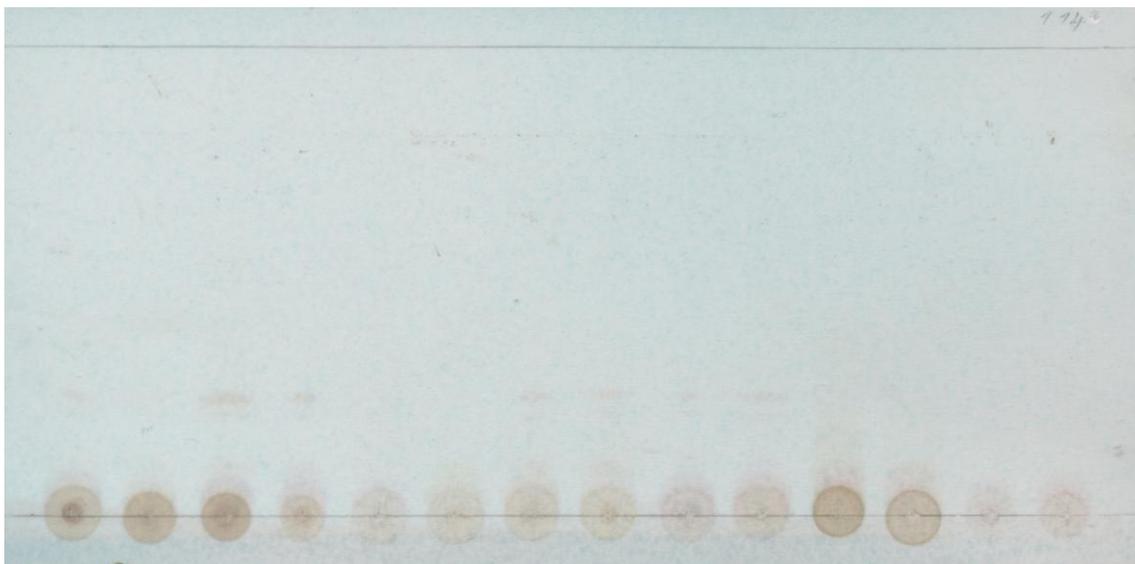


obr. č. 43



obr. č. 44

Detekce aminokyselin



obr. č. 45



obr. č. 46

Detekce fenolů, aminů

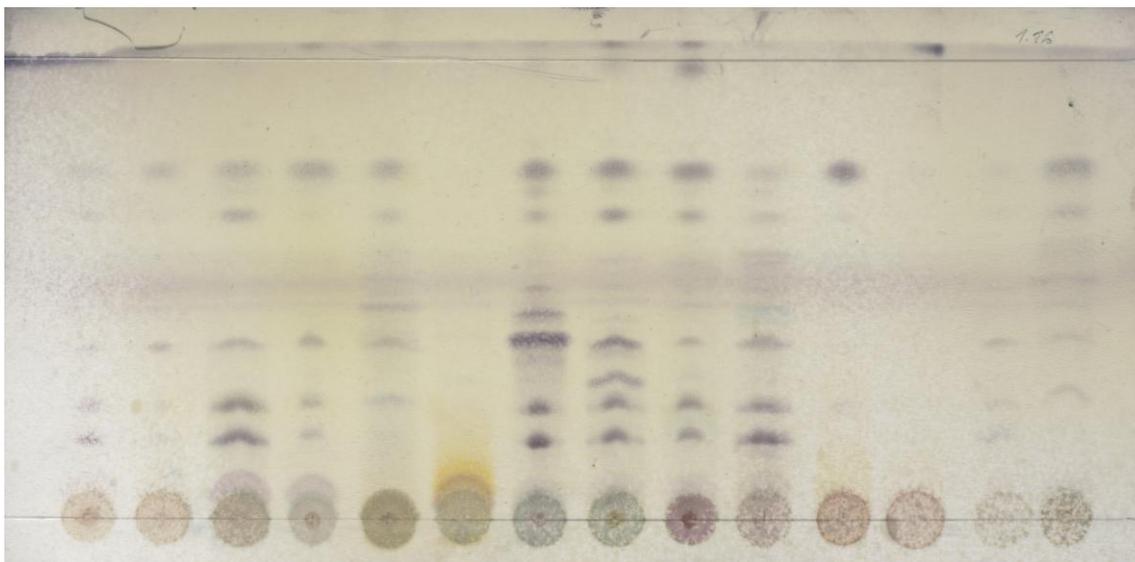


obr. č. 47

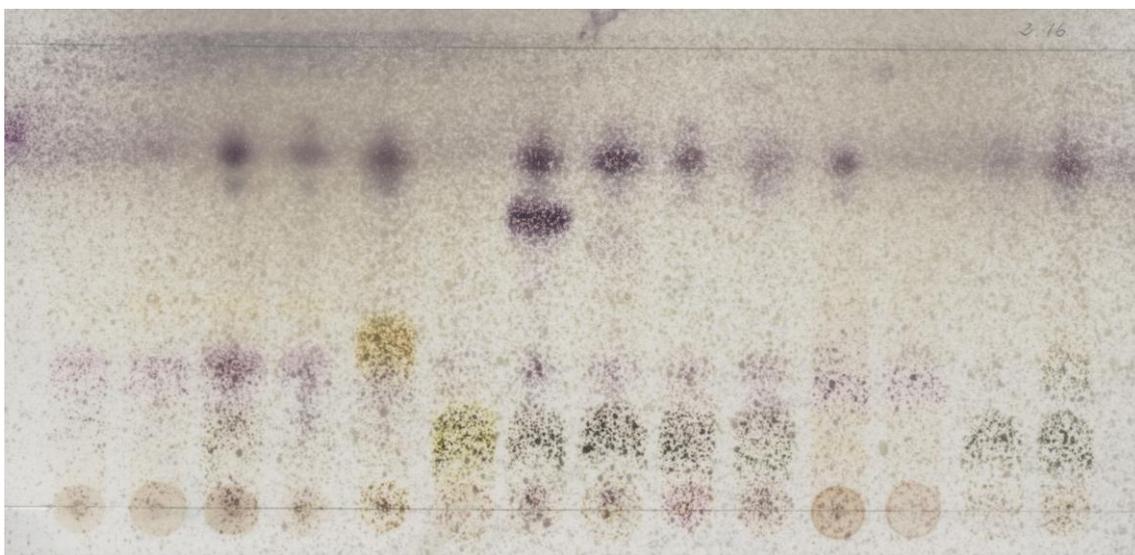


obr. č. 48

Detekce steroidů, fenolů, těkavých látek

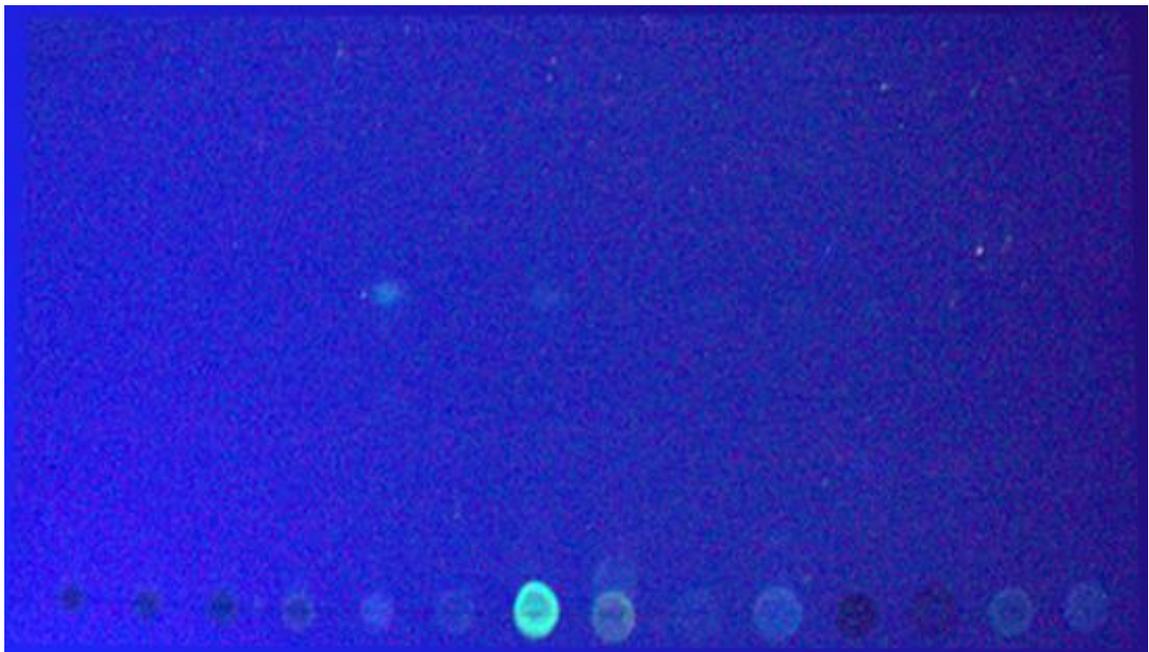


obr. č. 49

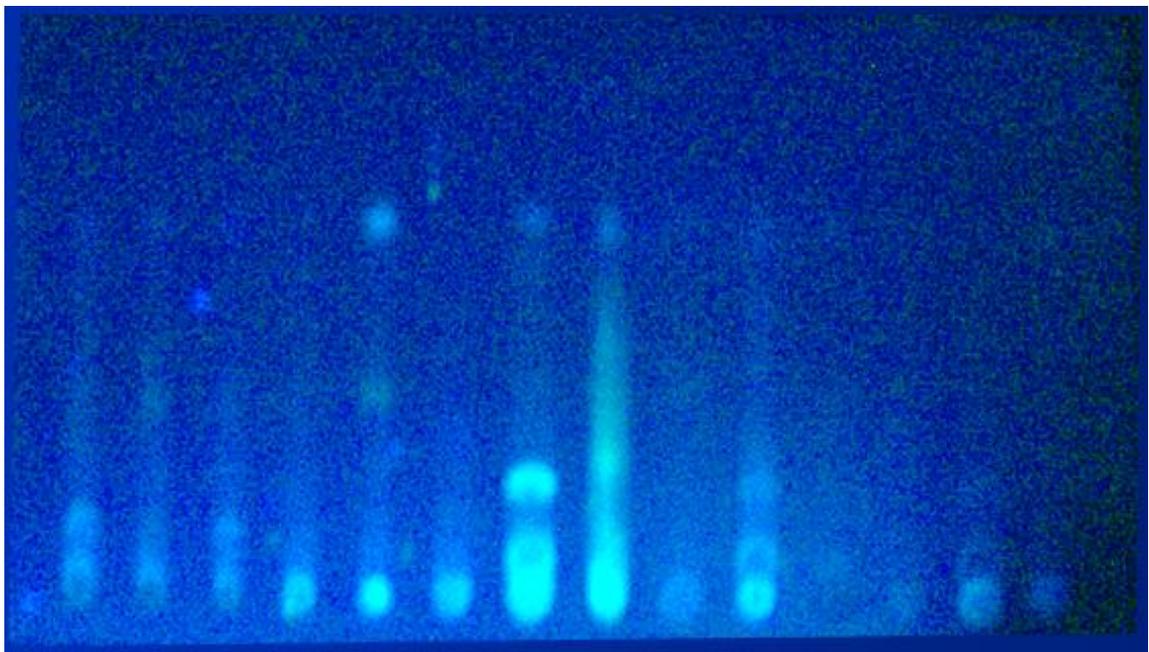


obr. č. 50

Detekce organických aromatických kyselin



obr. č. 51



obr. č. 52

Detekce ketóz

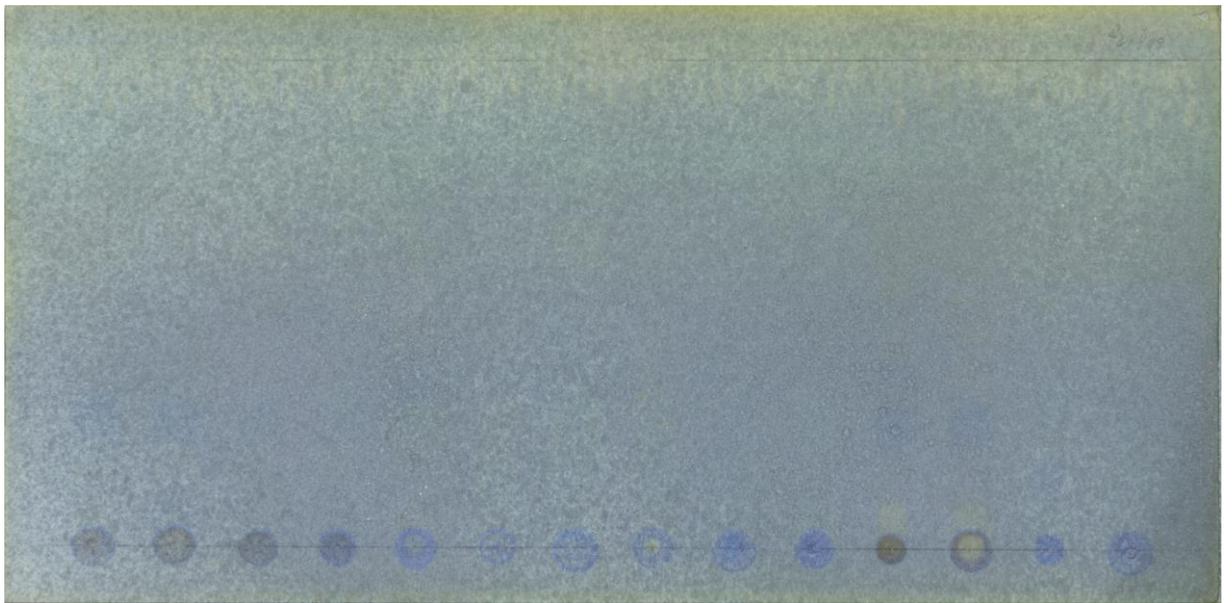


obr. č. 53



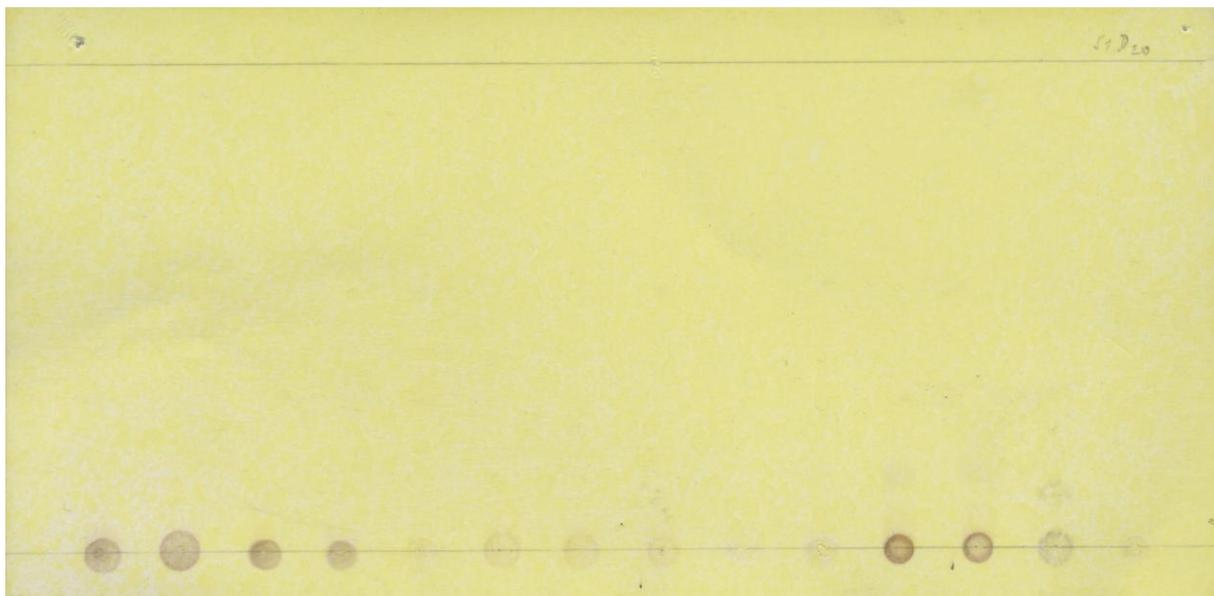
obr. č. 54

Detekce organických alifatických kyselin

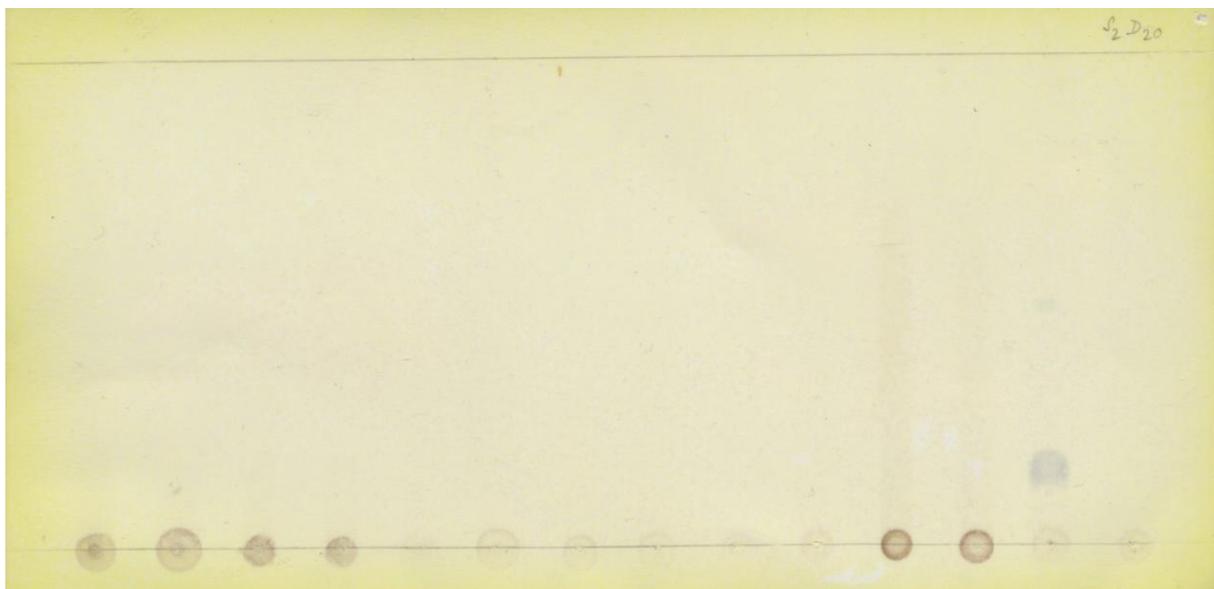


obr. č. 55

Detekce fenolů a hydroxamových kyselin

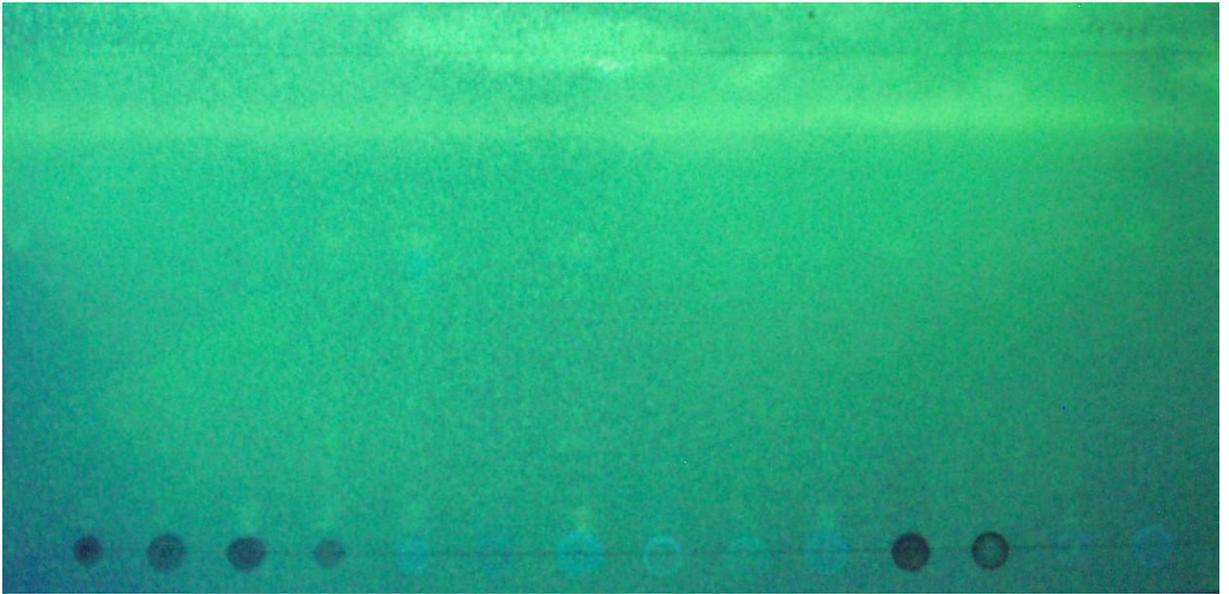


obr. č. 56

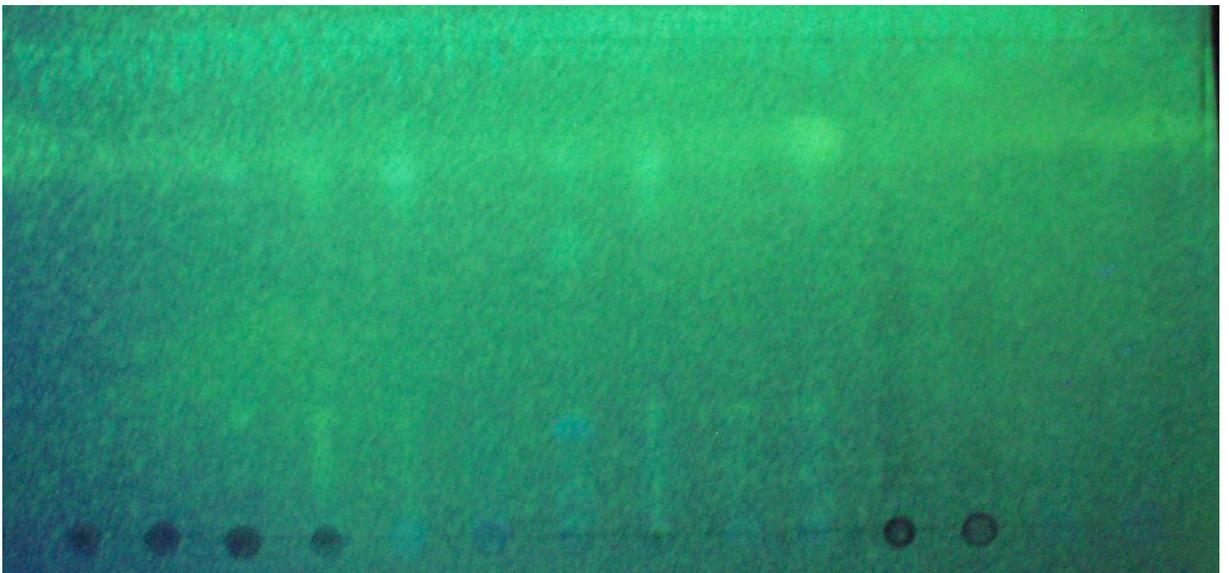


obr. č. 57

Detekce tuků, sterolů

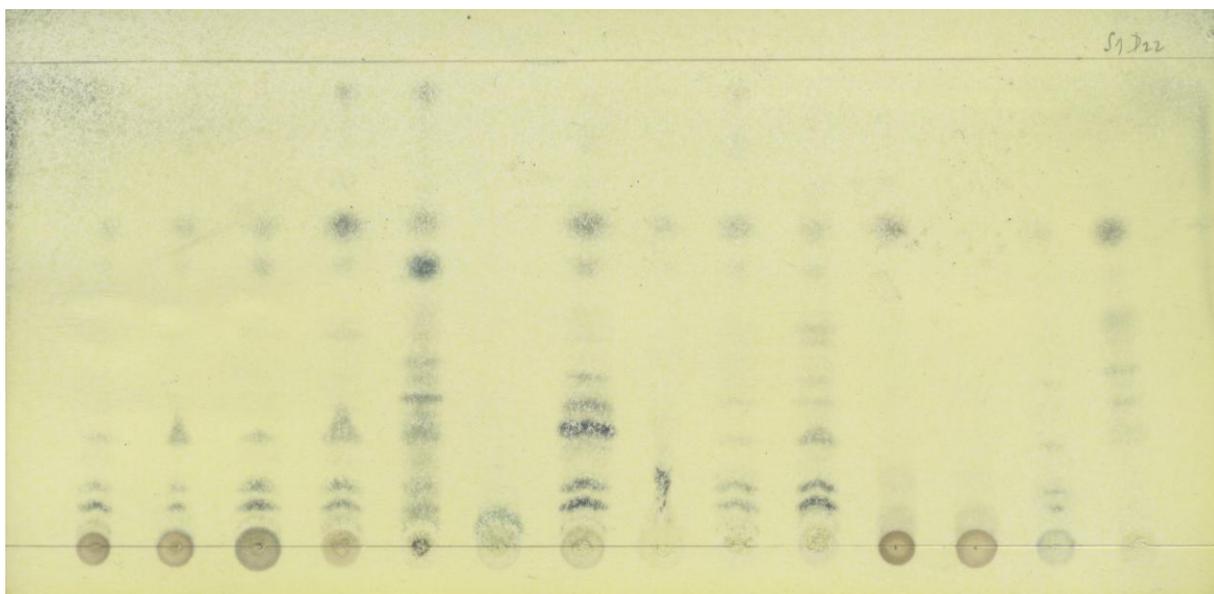


obr. č. 58

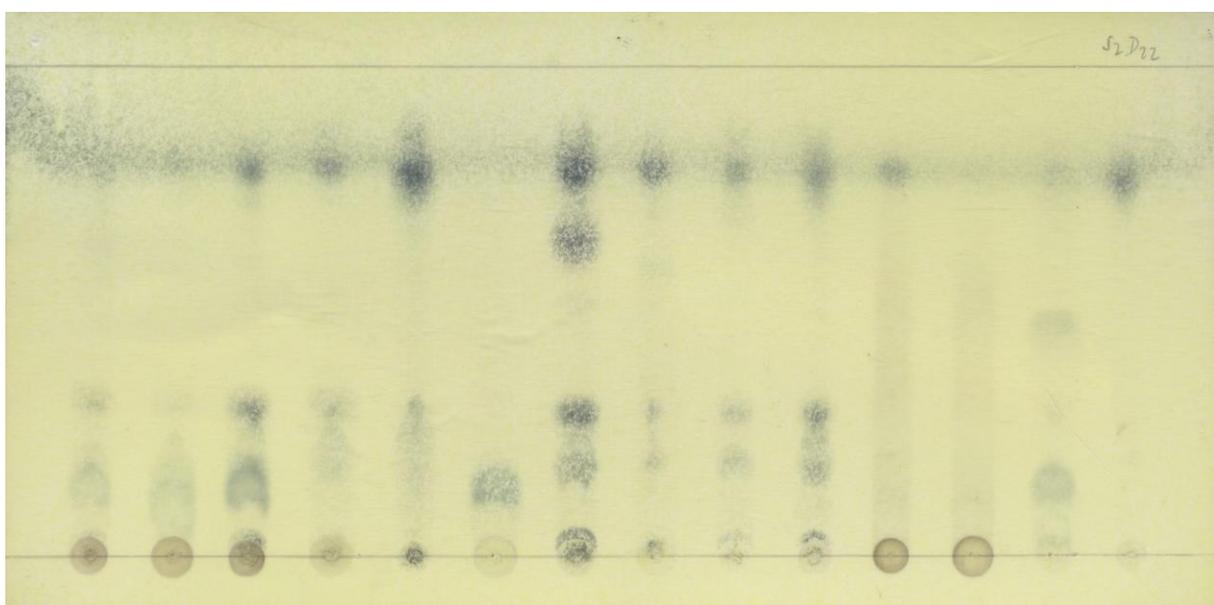


obr. č. 59

Detekce redukujících sloučenin



obr. č. 60



obr. č. 61

Detekce fenolů

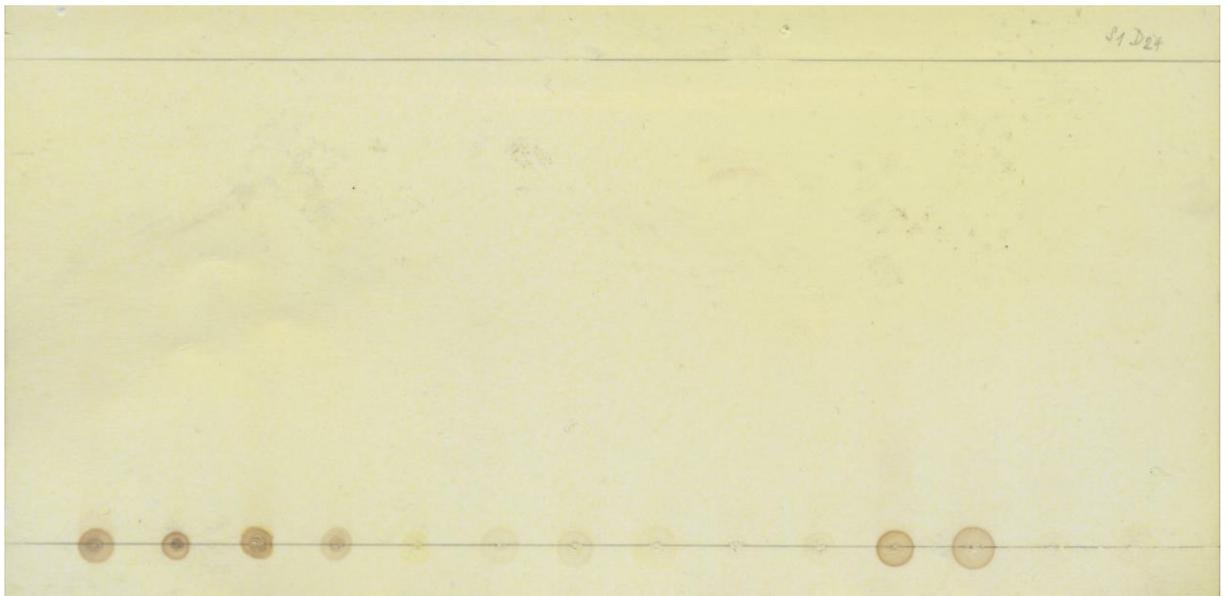


obr. č. 62

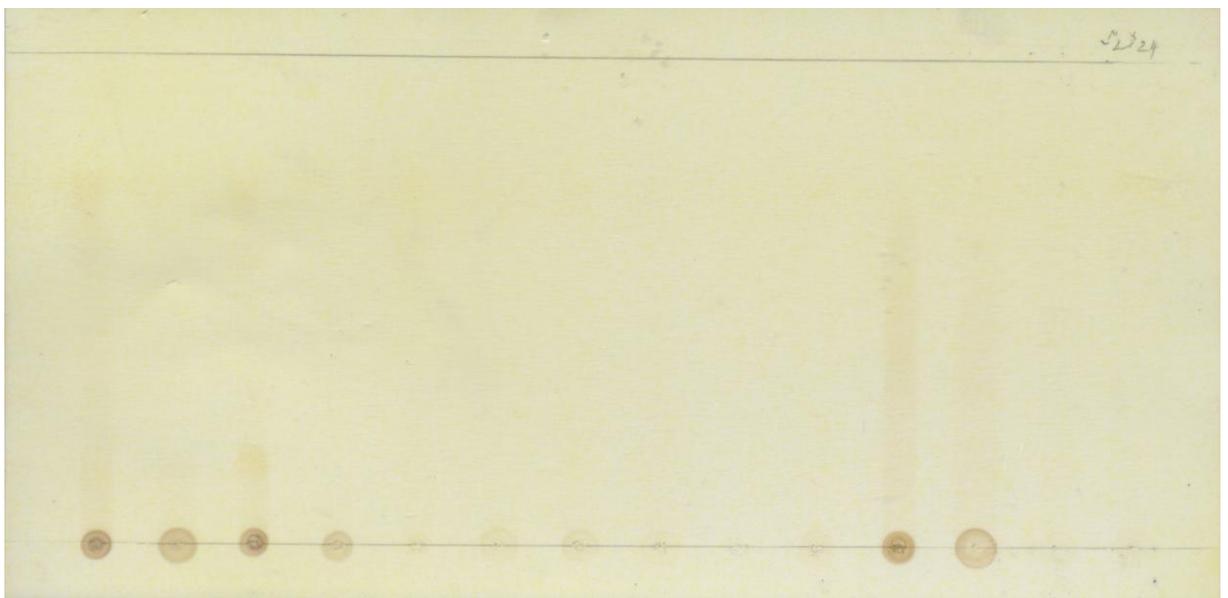


obr. č. 63

Detekce aldehydů



obr. č. 64



obr. č. 65

5.2 VYHODNOCENÍ REAKCÍ NA DETEKCE

Legenda k tabulkám 16-20

ST+ pozitivní reakce při detekci na startu

ST0 nebyla pozorována pozitivní reakce při detekci na startu

X⁺ počet pozitivních reakcí na detekci na dráze (X=1,2,3...)

0 žádná pozitivní reakce na detekci na dráze

Tab. č. 17 Výhodnocení výsledků reakcí na detekce

| Číslo ř | Taxon | D 15, S1 | D 15, S2 | Fenyly | Fenyly | Fenyly, aminy | Fenyly, aminy | Fenyly | Redukující sloučeniny (Fenyly, ...) | Redukující sloučeniny (Fenyly, ...) | Karboxylové kyseliny | Karboxylové kyseliny | D 9, S1 | D 9, S2 | Laktony | Laktony | D 11, S1 | D 11, S2 |
|---------|------------------------------------|---------------|---------------|--------|--------|---------------|---------------|--------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------|---------|----------|----------|
| 1 | <i>Agaricus bitorquis</i> | ST+, 1+ | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 2 | <i>Agaricus squamulifer</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 3 | <i>Agaricus vaporarius</i> | ST+, 1+ | ST+, 2+ | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 1+ | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 4 | <i>Macrolepiota bohemica</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 5 | <i>Clavariadelphus pistillaris</i> | ST0, 0 | ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 6 | <i>Cortinarius anomalus</i> | ST+, 2+ | ST+, 1+ | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 7 | <i>Hebeloma sinapizans</i> | ST+, 2+ | ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 8 | <i>Pholiota ahicola</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 9 | <i>Clitopilus prunulus</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 10 | <i>Entoloma clypeatum</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 11 | <i>Paxillus involutus</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 12 | <i>Paxillus rubicundulus</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 13 | <i>Pleurotus dryinus</i> | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST+, 1+ | ST0, 2+ | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 14 | <i>Pleurotus ostreatus</i> | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| | Detekovatelné skupiny | Fenyly, aminy | Fenyly, aminy | Fenyly | Fenyly | Fenyly, aminy | Fenyly, aminy | Fenyly | Redukující sloučeniny (Fenyly, ...) | Redukující sloučeniny (Fenyly, ...) | Karboxylové kyseliny | Karboxylové kyseliny | Karboxylové kyseliny | Karboxylové kyseliny | Laktony | Laktony | Laktony | Laktony |

Tab. č. 18 Vyhodnocení výsledků reakcí na detekce

| Číslo | Taxon | D4, S1 | D4, S2 | D6, S1 | D6, S2 | D13, S1 | D13, S2 | D3, S1 | D3, S2 | D16, S1 | D16, S2 | D7, S1 | D7, S2 |
|-----------------------|------------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----------------|-----------|
| 1 | <i>Agaricus bitorquis</i> | ST0, 1+ ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 6+ ST+, 3+ ST+, 0 | ST+, 6+ ST+, 3+ ST+, 0 | ST+, 2+ ST+, 5+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 2+ ST+, 5+ ST+, 0 | ST+, 2+ ST+, 5+ ST+, 0 | ST+, 2+ ST+, 5+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 2 | <i>Agaricus squamulifer</i> | ST0, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 3+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 3+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 2+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 2+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 2+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 2+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 3 | <i>Agaricus vaporarius</i> | ST0, 2+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 3+ ST+, 5+ ST+, 4+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 5+ ST+, 4+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 4+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 6+ ST+, 3+ ST+, 2+ ST+, 0 | ST+, 6+ ST+, 3+ ST+, 2+ ST+, 0 | ST+, 2+ ST+, 0 | ST+, 0 |
| 4 | <i>Macrolepiota bohemica</i> | ST0, 3+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 5 | <i>Clavariadelphus pistillaris</i> | ST+, 2+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST+, 0 | ST+, 2+ ST0, 2+ ST+, 6+ ST+, 3+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 6+ ST+, 3+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 6+ ST+, 3+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 6+ ST+, 3+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 6+ ST+, 3+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 6+ ST+, 3+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 6+ ST+, 3+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 6+ ST+, 3+ ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 6 | <i>Cortinarius anomalis</i> | ST+, 1+ ST0, 0 | ST0, 0 | ST+, 1+ ST0, 2+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 7 | <i>Hebeloma sinapizans</i> | ST+, 10 ST0, 2+ ST+, 2+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 2+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST+, 2+ ST0, 2+ ST+, 2+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 2+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 2+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 2+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 2+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 2+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 2+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 2+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 8 | <i>Pholiota alnicola</i> | ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 2+ ST+, 7+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 9 | <i>Clitopilus prunulus</i> | ST+, 2+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 10 | <i>Entoloma chypeatum</i> | ST+, 5+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 11 | <i>Paxillus involutus</i> | ST0, 1+ ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 12 | <i>Paxillus rubicundulus</i> | ST0, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 1+ ST+, 0 | ST+, 2+ ST0, 1+ ST0, 0 | ST+, 2+ ST0, 1+ ST0, 0 | ST+, 2+ ST0, 1+ ST0, 0 | ST+, 2+ ST0, 1+ ST0, 0 | ST+, 2+ ST0, 1+ ST0, 0 | ST+, 2+ ST0, 1+ ST0, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 13 | <i>Pleurotus dryinus</i> | ST+, 0 | ST0, 0 | ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 1+ ST0, 3+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 3+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 3+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 3+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 3+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 3+ ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 14 | <i>Pleurotus ostreatus</i> | ST+, 1+ ST0, 0 | ST0, 0 | ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 5+ ST0, 2+ ST+, 0 | ST0, 5+ ST0, 2+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 0 | ST0, 2+ ST0, 2+ ST+, 0 | ST0, 1+ ST0, 1+ ST+, 0 | ST0, 6+ ST0, 3+ ST0, 0 | ST0, 6+ ST0, 3+ ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| Detekovatelné skupiny | | Sachardy | Sachardy | Sachardy | Sachardy | Steroly | Steroly | Steroly, Steroidy, Terpeny | Steroly, Steroidy, Terpeny | Steroidy, fenoly, tékavé lát. | Steroidy, fenoly, tékavé lát. | Alkaloidy | Alkaloidy |

Tabulka č. 19 Výhodnocení výsledků reakcí na detekce

| Číslo t | Taxon | D17, S1 | D17, S2 | D21, S1 | D21, S2 | D18, S1 | D18, S2 | D19, S1 | D19, S2 |
|---------|------------------------------------|--------------|--------------|-------------------|-------------------|---------|---------|----------------------|----------------------|
| 1 | <i>Agaricus bitorquis</i> | ST+, 0 | ST+, 2+ | ST0, 1+ | ST0, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST0, 0 | ST+, 0 |
| 2 | <i>Agaricus squamulifer</i> | ST+, 0 | ST+, 1+ | ST0, 1+ | ST0, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST0, 0 | ST+, 0 |
| 3 | <i>Agaricus vaporarius</i> | ST+, 0 | ST+, 2+ | ST0, 1+ | ST0, 1+ | ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST+, 0 |
| 4 | <i>Macrolepiota bohemica</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST0, 2+ | ST0, 1+ | ST+, 0 | ST+, 0 | ST0, 0 | ST+, 0 |
| 5 | <i>Clavariadelphus pistillaris</i> | ST+, 1+ | ST+, 2+ | ST+, 2+ | ST+, 1+ | ST+, 0 | ST0, 1+ | ST0, 0 | ST+, 0 |
| 6 | <i>Corinarius anomalus</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST0, 0 | ST+, 0 |
| 7 | <i>Hebeloma sinapizans</i> | ST+, 0 | ST+, 3+ | ST+, 3+ | ST+, 3+ | ST+, 1+ | ST0, 2+ | ST0, 0 | ST+, 0 |
| 8 | <i>Pholiota ahnicola</i> | ST+, 1+ | ST+, 3+ | ST+, 0 | ST+, 1+ | ST+, 3+ | ST0, 1+ | ST0, 0 | ST+, 0 |
| 9 | <i>Clitopilus prunulus</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 1+ | ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST+, 0 |
| 10 | <i>Entoloma chypeatum</i> | ST+, 1+ | ST+, 1+ | ST+, 1+ | ST+, 1+ | ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST+, 0 |
| 11 | <i>Paxillus involutus</i> | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 1+ | ST0, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST0, 0 | ST+, 1+ |
| 12 | <i>Paxillus rubicundulus</i> | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST0, 0 | ST+, 1+ |
| 13 | <i>Pleurotus dryinus</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST+, 0 |
| 14 | <i>Pleurotus ostreatus</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 1+ | ST+, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST+, 0 |
| | Detekovatelné skupiny | UVλ = 365 nm | UVλ = 365 nm | UVλ = 254, 365 nm | UVλ = 254, 365 nm | Ketozy | Ketozy | Org. kyseliny alifat | Org. kyseliny alifat |

Tabulka č. 20 Vyhodnocení výsledků reakcí na detekce

| Číslo + | Taxon | D20, S1 | D20, S2 | Reduk. sloučeniny | Reduk. sloučeniny | D22, S1 | D22, S2 | Fenoly | Fenoly | D23, S1 | D23, S2 | Aldehydy | Aldehydy | D24, S1 | D24, S2 |
|---------|------------------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|---------|---------|--------|--------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
| 1 | <i>Agaricus bitorquis</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 5+ | ST+, 2+ | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 2 | <i>Agaricus squamulifer</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 4+ | ST+, 2+ | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 3 | <i>Agaricus vaporarius</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 5+ | ST+, 3+ | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 4 | <i>Macrolepiota bohemica</i> | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 6+ | ST+, 2+ | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 5 | <i>Clavariadelphus pistillaris</i> | ST0, 0 | ST0, 0 | ST+, 9+ | ST+, 2+ | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 6 | <i>Cortinarius anomalus</i> | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 1+ | ST0, 1+ | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 7 | <i>Hebeloma sinapizans</i> | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 8+ | ST+, 4+ | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 8 | <i>Pholiotia alnicola</i> | ST0, 1+ | ST0, 0 | ST0, 2+ | ST+, 3+ | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 9 | <i>Chitopilus prunulus</i> | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 5+ | ST+, 3+ | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 10 | <i>Entoloma clypeatum</i> | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 6+ | ST+, 4+ | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 11 | <i>Paxillus involutus</i> | ST+, 1+ | ST+, 0 | ST+, 2+ | ST+, 1+ | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 12 | <i>Paxillus rubicundulus</i> | ST+, 2+ | ST+, 0 | ST+, 1+ | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 | ST+, 0 |
| 13 | <i>Pleurotus dryinus</i> | ST0, 1+ | ST0, 2+ | ST+, 4+ | ST0, 3+ | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| 14 | <i>Pleurotus ostreatus</i> | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 4+ | ST0, 1+ | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 | ST0, 0 |
| | Detekovatelné skupiny | Fenoly, hydrox kys. | Fenoly, hydrox kys. | Reduk. sloučeniny | Reduk. sloučeniny | Fenoly | Fenoly | Fenoly | Fenoly | Fenoly | Fenoly | Aldehydy | Aldehydy | Aldehydy | Aldehydy |

V. DISKUSE

Má rigorózní práce je pokračováním rozsáhlého fytochemického studia hub oddělení Eumycota, kterým je na katedře farmaceutické botaniky a ekologie, věnována velká pozornost. Z hlediska látek působících nejen antioxidačně, ale ovlivňujících také trombocytární agregační aktivitu, aktivitu acetylcholinesterázy, aktivitu mozkové acetylcholinesterázy a prolylendopeptidázy. Studium těchto látek je velmi atraktivní, protože se jejich biologický účinek může demonstrovat v pozitivním ovlivnění některých významných civilizačních chorob, a to zejména onemocnění kardiovaskulárního systému (antioxidační a antiagregační aktivita) a neurodegenerativních onemocnění např. demencí Alzheimerova typu (antioxidační aktivita, vliv na mozkovou acetylcholinesterázu a prolylendopeptidázu).

Je jisté, že získání nového, respektive perspektivního léčiva v těchto oblastech je záležitostí zdlouhavou a velmi náročnou. Je pouze přáním, aby se výzkum v oblasti hub oddělení Eumycota, projevil reálně využitelnými výsledky. V praxi však není zcela potřebné používat k terapii jenom léčiva, ale mohou být použity také doplňky stravy. A to zejména v prevenci, které mohou významně zpomalit rozvoj uvedených civilizačních chorob.

V první fázi jsou v našem výzkumu snahy směřovány do této oblasti. V literatuře je uvedena řada zajímavých údajů z oblasti fytochemického výzkumu hub oddělení Eumycota (asijské druhy), které mohou být prakticky využity. Metabolismus těchto hub je výrazně odlišný od metabolismu vyšších rostlin. Houby obsahují podstatně vyšší obsah vody, než rostliny. Musí být zpracovávány převážně v čerstvém stavu, protože jejich sušení je zdlouhavější a kromě toho dochází k významně k rozkladu látek (působením fenoloxidáz), výsledkem čehož je významné zhnědnutí sušeného materiálu. Hladina enzymů a jejich aktivita uplatňující se při zpracování hub je podstatně vyšší, než u vyšších rostlin; z toho plyne určité nebezpečí zvýšené destrukce sekundárních metabolitů, které jsou z terapeutického hlediska atraktivnější.

Houby produkují především primární metabolity (sacharidy, tuky), ze sekundárních metabolitů většinou nemalé množství ergosterolu a celkově vzato je produkce ostatních typů sekundárních metabolitů relativně nízká. Z toho plynou těžkosti uplatňující se při

izolaci biologicky aktivních dosud neznámých sekundárních metabolitů. V první fázi je vhodné pracovat s čerstvým, většinou zmraženým materiálem (někdy i v inertním prostředí). V dalším postupu odstranit především lipidní látky a nízkomolekulární sacharidy a teprve potom se věnovat separaci zbylých „atraktivních“ sloučenin. Z toho plyne, že pro izolaci čistých individuí, ověření jejich struktury a screening biologické aktivity, je potřebné zpracovat kilogramy až desítky kilogramů čerstvého mycelia. U taxonů průmyslově introdukovatelných (*Agaricus campestris*, *Pleurotus ostreatus* a další, zejména asijské houby) není problémem toto velké množství materiálu zajistit. Problém však nastává při zpracování hub získatelných pouze z přírodních zdrojů, protože jejich zajištění v tak velkém množství je nereálné, navíc je situace komplikovaná skutečností, že mladé plodnice mají jiný metabolický profil, než houby staré. Je tedy samozřejmé, že se v literatuře vyskytuje velké množství údajů, týkajících se především těchto „známých“ hub. Nutno však říci, že toto je pro výzkum ostatních hub atraktivnější, protože tyto taxony v sobě skrývají zcela určitě řadu metabolitů, které mohou obohatit spektrum preventivní a kurativní medicíny. S přihlédnutím k těmto faktům jsem postupovala při zpracování hub v této práci. Pro přípravu extraktu byl použit 70% ethanol v poměru houbová část k ethanolu 1:15. Uvedená koncentrace a poměr se ukázaly jako optimální proto, aby bylo z houbové tkáně izolováno maximum nízkomolekulárních látek polárního a středně polárního typu. Zatímco látky nepolární měly zůstat v matrix houby. Je pochopitelné, že však tyto látky (zejména lipidy), do tohoto extraktu pak také přešly a v konečné fázi je proto bylo nutné odstranit. To se podařilo zahuštěním primárního alkoholového extraktu a přidáním vody. Látky lipidní povahy (zejména mastné kyseliny a glyceridy) se vyloučily ve formě olejových skvrn, zatímco ostatní látky zůstaly rozpuštěny v roztoku (v důsledku vzájemné solubilizace). Čistý filtrát byl lyofilizován a zpracován běžným způsobem. Aby se předešlo případnému rozkladu látek, byly terminální práce prováděny v přítomnosti argonu a lyofilizát také uskladňován při -25°C pod argonem. Použitá metoda sledování antioxidační aktivity pomocí DPPH radikálu reaguje s takovými antioxidanty, které jsou donory vodíku. Z tohoto důvodu je zřejmé, že budou reagovat především látky fenolické a všechny ostatní sloučeniny (alifatického typu), které jsou schopné vodík odštěpovat. Pro základní orientaci bylo nutné provést tenkovrstvou chromatografií ve 2 soustavách. Soustava S1 je pro méně až středně polární metabolity, S2 pro metabolity nepolární. Skupinově byly chromatogramy detekovány celkem 24 čidly, které poskytovaly detekci nespecifickou (v UV), na steroly, fenolické látky, cukry, alkaloidy,

organické kyseliny, laktony, aminokyseliny, lipidy, aldehydy a ketony. Protože toto jsou hlavní metabolity, které se na základě literatury v houbách nejčastěji vyskytují.

Ze všech 14 hub se jako nejaktivnější (tzn. takové, které snižovaly absorbanci minimálně o 50 %) ukázaly houby č. 1 (*Agaricus bitorquis*; 71,5 %), č. 2 (*Agaricus squamulifer*; 65,3 %), č. 3 (*Agaricus vaporarius*; 72,5 %), č. 11 (*Paxillus involutus*; 69,4 %) a č. 12 (*Paxillus rubicundulus*; 65,7 %). Z těchto hub jsou jedlé pouze pečárky (čísla 1, 2 a 3), ostatní taxony jsou jedovaté (č. 11) a nejedlé (č. 12). Pro praktické použití jsou zajímavé antioxidační účinky především jedlých hub. Fytochemické studie pečárek uváděné v literatuře jsou poměrně ojedinělé. Zdá se, že hlavní nízkomolekulární obsahovou látkou je agaritin, který se vyskytuje patrně ve většině jedlých pečárek. Vzhledem ke své chemické struktuře (hydrazin a karboxylová kyselina) bude patrně látkou výrazně reagující s DPPH. Hlavní pozornost byla věnována detekci fenolických látek. Z hlediska antioxidační aktivity se ukazují jako velmi perspektivní pro další použití zástupci rodu *Agaricus*. Jen další fytochemické studium může po izolaci obsahových látek ukázat o jaké sloučeniny se jedná po srovnání s údaji v literatuře, případně toxikologickými testy ozřejmit, zda jsou tyto makromycety vhodnou surovinou pro přípravu sumárních extraktů použitelných ve výrobě doplňků stravy.

| Číslo | Název houby | Pokles absorbance (%) při koncentraci 1 mg/ml |
|-------|------------------------------------|--|
| 1 | <i>Agaricus bitorquis</i> | 71,517 |
| 2 | <i>Agaricus squamulifer</i> | 65,323 |
| 3 | <i>Agaricus vaporarius</i> | 72,527 |
| 4 | <i>Macrolepiota bohemica</i> | 45,860 |
| 5 | <i>Clavariadelphus pistillaris</i> | 6,213 |
| 6 | <i>Cortinarius anomalus</i> | 29,133 |
| 7 | <i>Hebeloma sinapizans</i> | 33,823 |
| 8 | <i>Pholiota alnicola</i> | 29,207 |
| 9 | <i>Clitopilus prunulus</i> | 4,860 |
| 10 | <i>Entoloma clypeatum</i> | 16,757 |
| 11 | <i>Paxillus involutus</i> | 69,410 |
| 12 | <i>Paxillus rubicundulus</i> | 65,727 |
| 13 | <i>Pleurotus dryinus</i> | 12,050 |
| 14 | <i>Pleurotus ostreatus</i> | 8,653 |

Tab. č. 21 Seznam hub a jejich antioxidační aktivita

| Prokazovaná skupina látek | Detekční činidla |
|-------------------------------|---------------------------------|
| aldehydy | D24 |
| alkaloidy | D7 |
| aminokyseliny | D12, D14 |
| aminy | D8, D15 |
| fenoly | D5, D8, D10, D15, D16, D20, D23 |
| hydroxamové kyseliny | D20 |
| karboxylové kyseliny | D9 |
| ketózy | D18 |
| laktony | D11 |
| organické alifatické kyseliny | D19 |
| organické aromatické kyseliny | D17 |
| redukující sloučeniny | D10, D22 |
| sacharidy | D4, D6 |
| steroidy | D3, D16 |
| steroly | D3, D13, D21 |
| těkavé látky | D16 |
| triterpeny | D3 |
| tuky | D21 |

Tab. č. 22 Seznam prokazovaných látek a detekčních činidel

Výsledky detekce jednotlivých typů látek:

Reakce s D5 byla ve všech případech v S1 nepřesvědčivá, u S2 rovněž.

Reakce s D8 poskytly v S1 na startu jak u *Agaricus*, tak *Paxillus* temně hnědé skvrny; v S2 byla patrná řada pozitivně reagujících látek (žlutohnědá až fialová).

Pozitivní reakce na startu nastala u všech 5 hub při D10 v S1, v případě S2 jsou patrné markantní skvrny jak u rodu *Agaricus*, tak u *Paxillus*.

Reakce s D15 v S1 poskytla nevýraznou reakci s zástupci rodu *Agaricus*, ale poměrně výraznou reakci s rodem *Paxillus*. V případě S2 to bylo stejné. Reakce u zástupců rodu *Paxillus* byla výrazná. Z rodu *Agaricus* reagoval výrazně pouze *Agaricus vaporarius*.

Z těchto údajů vyplývá, že fenolické látky jsou těchto extraktech přítomny a jsou patrně základem antioxidační reakce.

Reakce s D24 poskytovala slabé zbarvení žlutooranžové u všech 3 zástupců rodu *Agaricus* a také u rodu *Paxillus*.

| Číslo | Taxon | Skupiny látek s pozitivní reakcí |
|-------|------------------------------|--|
| 1 | <i>Agaricus bitorquis</i> | aldehydy, aminokyseliny, aminy, fenoly, steroidy, steroly, těkavé látky |
| 2 | <i>Agaricus squamulifer</i> | aldehydy, aminokyseliny, aminy, fenoly, steroidy, steroly, těkavé látky |
| 3 | <i>Agaricus vaporarius</i> | aldehydy, aminokyseliny, aminy, fenoly, steroidy, steroly, těkavé látky |
| 11 | <i>Paxillus involutus</i> | aldehydy, fenoly, organické aromatické kyseliny, steroidy, steroly, těkavé látky |
| 12 | <i>Paxillus rubicundulus</i> | aldehydy, fenoly, steroidy, steroly, těkavé látky |

Tab. č. 23 Prokázané látky u jednotlivých taxonů

VI. LITERATURA

1. Garibovová, L.V., Svrček, M., Baier, J.: Houby poznáváme, sbíráme, upravujeme, nakladatelství Lesnaja promyšlenost', Moskva 1981, překlad Lidové nakladatelství Praha 1989, 253 s.
2. Veselý, R., Kotlaba, F., Pouzar, Z.: Přehled československých hub, Nakladatelství Academia Praha, 1972, 424 s.
3. http://www.mycoweb.com/CAF/species/Agaricus_bitorquis.html.
4. http://www.grzyby.pl/gatunki/Agaricus_bitorquis.htm.
5. http://www.paxillus.ch/frame_agricales.html.
6. Hagara, L., Antonín, V., Baier, J.: Houby, nakladatelství Aventinum, 1999, 416 s.
7. http://www.kki.pl/zenit/grzyby_spyt/ga327.htm.
8. Keizer, G.J.: Encyklopedie hub, Rebo Production, Praha 1998, 288 s.
9. http://www.grzyby.pl/gatunki/Macrolepiota_rachodes_var_bohemica.htm.
10. Breitenbach, J. et Kränzlin, F.: Pilze der Schweiz, Band 4, Blätterpilze 2. Teil, Verlag Mycologia, Luzern, s. 371.
11. http://www.kki.pl/zenit/grzyby_spyt/ga671.htm.
12. http://www.grzyby.pl/gatunki/Cortinarius_anomalus.htm.
13. Hrdina, V., Hrdina, R., Jahodář, L. a kol.: Přírodní toxiny a jedy, Galén a Karolinum, Praha, 2004.
14. http://www.mykoweb.com/CAF/species/Hebeloma_sinapizans.html.
15. http://www.grzyby.pl/gatunki/Pholiota_alnicola.html.
16. http://www.kki.pl/zenit/grzyby_spyt/ga678.htm.
17. <http://www.chilton.u-net.com/eclyp.htm>.
18. http://www.mykoweb.com/CAF/species/Paxillus_involutus.html.
19. http://www.grzyby.pl/gatunki/Paxillus_filamentosus.htm.
20. http://www.grzyby.pl/gatunki/Pleurotus_dryinus.htm.
21. http://www.grzyby.pl/gatunki/Pleurotus_ostreatus.htm.
22. http://www.houby.humlak.cz/obsah/latky_v_houbach.htm.
23. <http://www.sci.muni.cz/botany/studium/mykolog.htm>.
24. <http://www.home.zf.jcu.cz/public/departments/krv/rostlin/doktor/zabka/zabka.htm>.

25. Schulzová, V., Hajšlová, J., Peroutka, R.: Influence of storage and household processing on the agaritine content of the cultivated *Agaricus* mushroom. *Food Additives & Contaminants* 19 (9), 853-862, (2002), cit. dle Chem. Abstr. 137, 384027 (2002).
26. Stijve, T., Pittet, A. : Absence of agaritine in *Pleurotus* species and in other cultivated and wild growing mushrooms not belonging to the genus *Agaricus*. *Lebensmittel-Rundschau* 96 (7), 251-254, (2000), cit dle Chem. Abstr. 133, 134478 (2000).
27. Steglich, W., Steffan, B., Stroech, K., Wolf, M.: Pistillarine a characteristic metabolite of *Clavariadelphus pistillaris* and several Basidiomycetes. *Journal of Biosciences* 39C (1-2), 10-12, (1984), cit. dle Chem. Abstr. 100, 153835 (1984).
28. Cole, R.J., Schweikert, M.A.: Handbook of secondary fungal metabolites Volume II, Academic Press, 2003, s. 573.
29. De Bernardi, M., Fronza, G., Gianotti, M.P.: Fungal metabolites XIII.. *Tetrahedron Letters* 24 (15), 1635-1638, (1983), cit dle Chem. Abstr. 99, 102241 (1983).
30. Fujimoto, H., Takano, Y., Yamazaki, M.: Isolation, identification and pharmacological studies on three toxic metabolites from a mushroom *Hebeloma spoliatum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 40 (4), 869-872, (1992), cit dle Chem. Abstr. 92405328 (1992).
31. Berg, A., Haertl, A., Graefe, U.: Use of substituted lanostane derivatives as inhibitors of 3 α -hydroxysteroiddehydrogenase. (Hans-Knoell-Institut Fuer Naturstoff-Forschung E.V., Germany), Ger. Offen. (2003), 20030130, cit. dle Chem. Abstr. 138, 131560 (2003).
32. Jandric, Z., Prostenik, M.: Lipid of higher fungi. Hydrocarbons in fruit bodies of mushrooms. *Rad Jugoslavenske Akademije Znanosti i Umjetnosti* 425, 41-46, (1986), cit. dle Chem. Abstr. 108, 3412 (1988).
33. Badalyan, S.M., Gasparyan, A.V.: Study of antioxidant activity of certain basidial macromycetes. *Mikologiya i Fitopatologiya* 37 (5), 63-68, (2003), cit. dle Chem. Abstr. 140, 142311 (2004).
34. Wang, M., Trigueros, V.: Proteins as active compounds involved in insecticidal activity of mushroom fruitbodies. *Journal of Economic Entomology* 95 (3), 603-607, (2002), cit dle Chem. Abstr. 137, 181086 (2002).

35. Rapior, S., Croze, P.: Volatile components of ten frozen mushrooms. *Journal of Essential Oil Research* 8 (1), 63-66, (1996), cit. dle Chem. Abstr. 124, 226473 (1996).
36. Wood, W. F., Brandes, M., Richard, L.: Trans-2-nonenal, the cucumber odour of mushrooms. *Mycologia* 86 (4), 561-563, (1994), cit. dle Chem. Abstr. 121, 276353 (1994).
37. Wilkins, W. H.: Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. *British Journal of Experimental Pathology* 33, 340-342, (1952), cit. dle chem. Abstr. 46, 67525 (1952).
38. Yamaji, K., Ishimoto, H., Usui, N.: Organic acids and water soluble phenolics produced by *Paxillus* species. *Mycorrhiza* 15 (1), 17-23, (2005), cit. dle Chem. Abstr. 36128 (2005).
39. Antkowiak, R., Antkowiak, W. Z., Banczyk, J.: A new phenolic metabolite involutone isolated from the mushroom *Paxillus involutus*. *Canadian Journal of Chemistry* 81 (1), 118-124, (2003), cit. dle Chem. Abstr. 139, 288687 (2003).
40. Spoerke, D. G., Rumack, B. H.: *Handbook of mushroom poisoning diagnosis and treatment*, CRC press 1994, 456 s.
41. Kang, S.: Cosmetic composition containing extract of *Pleurotus ostreatus*; *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo* (2001), 2001080856, cit. dle Chem. Abstr. 1144072, (2004).
42. M. C. M. Klosterfrau Vertriebsgesellschaft MbH Germany : β -glucan combinations as food and other additive. *Ger. Gebrauchsmusterschrift* (2005), 20050428, cit. dle Chem. Abstr. 142, 410198 (2005).
43. Cucuianu, V., Bratanescu, V., Sterizu, B.: The edible mushrooms an organic food and its potential use for health. *Journal of Environmental Protection and Ecology* 5 (4), 801-808, (2004), cit. dle Chem. Abstr. 202658 (2005).
44. Hozová, B., Kuniak, L., Kelemenová, B.: Application of β -D-glucans isolated from mushroom *Pleurotus ostreatus* (pleuran) and *Lentinus edodes* (lentinan) for increasing bioactivity of yoghurts. *Czech Journal of Food Science* 22 (6), 204-214, (2004), cit. dle Chem. Abstr. 164143 (2005).
45. 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.

46. Paseková, H., Polášek, M., Solich, P.: Sekvenční injekční analýza, Chem. Listy 93, 354 – 359 (1999).
47. 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. Journal of Chromatography A, 912 (1), 73-82 (2001).
48. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C.: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaftliche Technologie 28 (1), 25-30 (1995).
49. 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.
50. Opletal, L., Karlíčková, J.: Ústní sdělení.
51. Stahl, E.: Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook, Springer Berlin, Berlin-Heidelberg-New York 1969, 1042 s.
52. York, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H.: Thin layer chromatography, Reagents and detection methods, 496 s.
53. Nožičková, J.: Biologická aktivita makromycet IV., Diplomová práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2005, 77 s.