

UNIVERSITA KARLOVA PRAHA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOSIE

Histochemický důkaz fenolických látek v sekrečních útvarech drog

Pavla Vystrčilová

Datum zadání: 29.10.2004

Datum obhajoby: 15.5.2006

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Oponent: doc. RNDr. Jiřina Dušková, CSc.

Hradec Králové

2006

Děkuji doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. za laskavé vedení a odborné připomínky k diplomové práci.

Prohlašuji, že jsem na této diplomové práci pracovala samostatně a použila jsem jen uvedenou literaturu.

Vlasta Pačá

OBSAH:

1. ÚVOD	5
2. CÍL PRÁCE	7
3. TEORETICKÁ ČÁST	
3.1 Histochemický důkaz monoterpenických fenolů	8
3.2 Čeleď <i>Lamiaceae</i>	
3.2.1 Obecná charakteristika	9
3.2.2 Charakteristika jednotlivých sledovaných druhů	10
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	
4.1 Materiál, chemikálie a potřeby	24
4.2 Provedení histochemického důkazu	26
5. VÝSLEDKY	27
6. DISKUSE	39
7. ZÁVĚR	48
8. POUŽITÁ LITERATURA	49

1. ÚVOD

Monoterpeny jsou látky, které jsou odvozeny od kyseliny mevalonové a řadíme je do skupiny tzv. izoprenoidů. Tyto látky patří mezi sloučeniny, které obsahují desetiuhlíkatý řetězec, tzn. že se skládají ze dvou izoprenových jednotek (2-methylbutadienových). Tyto izoprenové jednotky bývají spojeny systémem “hlava – pata”, čímž vzniká geranyldifosfát – výchozí sloučenina při tvorbě monoterpenů.

Acyklické a cyklické monoterpeny se vyskytují v přírodě jako uhlovodíky, častěji pak jako jejich kyslíkaté deriváty – alkoholy, aldehydy, ketony a fenoly. Deriváty se zpravidla vyznačují příjemnou vůní.

Monoterpeny jsou látky těkavé a tvoří hlavní složku silic. Podle převládajícího typu složky dělíme silice do skupin, které obsahují:

- a) uhlovodíky – např. myrcen, ocimen, limonen, terpinen
- b) alkoholy – např. geraniol, linalool, mentol
- c) aldehydy – např. citral, geranial
- d) ketony – např. karvon, iron
- e) fenoly – např. eugenol, tymol, karvakrol
- f) fenolické étery – např. anetol
- g) estery
- h) peroxidy a oxidy – např. askaridol (1,2)

Monoterpenické fenoly jsou složkou silice, která se vyskytuje ve žlázatých sekrečních útvarech rostlin z čeledi *Lamiaceae*. Jedná se o žlázy typické pro tuto čeleď. Tyto sekreční útvary jsou místem akumulace silice, tedy i monoterpenických fenolů.

Místa lokalizace a akumulace těkavých látek lze zjistit pomocí histochemických metod, přičemž se jedná o zdokonalený bodový test popsany Feiglem, jenž se původně používal k organické analýze fenolů *in vitro*.(9)

Histochemické metody se rozvíjely ke kvantitativní a kvalitativní analýze všech buněčných komponent (vč. sacharidů, proteinů a iontů obsažených v buněčných tekutinách). Tyto metody, v kombinaci s rozličnými mikroskopickými technikami, mohou být použité i ke studiu sekrece silic v rostlinných pletivech.(9) K důkazu fenolických látek v silici se využívá

např. chemická reakce, při které dochází k barevné změně. Z bezbarvých výchozích látek reakcí s činidlem získáme specifický barevný produkt. Činidlem pro detekci fenolických monoterpenů ve žlázkách čeledi *Lamiaceae* byl p-nitrosifenol v přítomnosti koncentrované kyseliny sírové. Tato reakce vedla ke vzniku barevných indofenolů.

Monoterpenické fenoly a jejich zdroje jsou pro své účinky předmětem mnoha výzkumů z oblasti farmaceutického, kosmetického a potravinářského průmyslu. Např. tymol a karvakrol jsou potenciální antioxidanty významné pro komerční využití. Mají také inhibiční účinky na několik bakterií spojených s infekčním onemocněním. A do budoucna se nabízí k dalšímu komerčnímu využití.(9)

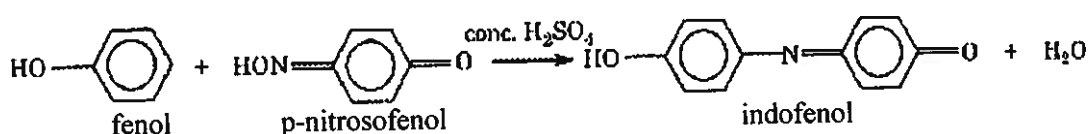
2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo provést sérii histochemických důkazů na rostlinném materiálu z čeledi *Lamiaceae* a zjistit přítomnost monoterpenických fenolů v sekrečních útvarech daných rostlin.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Histochemický důkaz monoterpenických fenolů

K detekci různých obsahových látek se využívá řada histochemických metod, které používají jako činidel řadu chemických sloučenin. Metoda k detekci monoterpenických fenolů využitelná k *in vivo* detekci fenolů v rostlinném materiálu je založena na kondenzační reakci fenolů s p-nitrosofenoly v přítomnosti koncentrované H₂SO₄, která vede ke vzniku specifických barevných produktů:



Reakce je specifická pro *ortho*- a *meta*- substituované fenoly. Při kondenzaci substituovaných fenolů s p-nitrosofenolem atakuje reaktivní vodík v *para* poloze aromatického jádra hydroxylovou skupinu, současně dochází k odštěpení jedné molekuly vody. *Ortho*- a *meta*- substituce je charakteristická pro v přírodě se vyskytující monoterpenické fenoly. Barva výsledného indofenolu závisí na typu přítomné fenolické látky. Výsledné barvy mohou být různé např. za přítomnosti tymolu se tvoří červeně zbarvený indofenol, karvakrol je zase identifikován na základě zeleného zbarvení vzniklého indofenolu. Ke kondenzační reakci dochází v sekrečních útvarech čeledi *Lamiaceae*. Tyto sekreční žlázy se nachází na obou stranách listu a jsou místem akumulace silice a v ní obsažených monoterpenických fenolických látek.(9)

K identifikaci a zjišťování obsahových látek v rostlinných pletivech nebo sekrečních útvarech se nevyužívá pouze výše zmiňovaná metoda, ale i řada dalších metod s použitím jiných činidel. Např. Schiffovo činidlo se používá k detekci monoterpenických aldehydů neralu a geraniolu (citralu) a lipofilní barviva “Súdánská červeně” a “Nilská modř” jsou používány k lokalizaci silice v listech *Salvia aurea* (*Lamiaceae*).⁽¹²⁾ Anilinová (“Nilská”) modř bývá používána k histochemickému určení struktury sekrečních orgánů opět u *Salvia aurea*, speciálně k důkazu kutinu, jako složky buněk tvořících žláznaté trichomy. Histochemická metoda využívající nitrokyselinu jako činidlo byla použita k lokalizaci a

detekci fenolů u zástupců z různých čeledí a v jehličí *Picea abies*; v obou případech byly fenoly zjišťovány souborně a nebyly identifikovány jednotlivé složky.(9)

3.2 Čeleď *Lamiaceae*

3.2.1 Obecná charakteristika

Čeleď *Lamiaceae* je velmi obsáhlá. Zahrnuje asi 200 rodů (přičemž u nás planě rostoucích je pouze 23) a 3200 druhů. Tato čeleď je rozšířena hlavně v teplých a suchých oblastech.

Nejčastěji jsou zastoupeny byliny, řidčeji pak polokeře případně keře s lodyhami většinou čtyřhrannými až čtyřkřídlymi.

Listy jsou vstřícné a křížmostojné, zřídka je můžeme nalézt v přeslenech a zpravidla bývají jednoduché. Tvar listu je zubatý, pilovitý nebo vroubkatý, řidčeji jsou listy celokrajné. Výjimečně mohou být dlanitě složené. Na povrchu jsou chlupaté, huňaté až plstnaté.

Květy jsou oboupohlavné, různobalné, sympetální a synsepální, pěti- řidčeji čtyřčetné. Koruna přechází ve dva pysky, horní pysk srůstá ze dvou a dolní pysk ze tří korunních cípů. Uvnitř květu čtyři tyčinky srůstají nitkami s korunní trubkou, pátá tyčinka vymizela. Pestík srůstá ze dvou plodolistů. Semeník je svrchní a dvoupouzdrý (v každém pouzdře má dvě semena).

Plody jsou čtyři tvrdky ve vytrvalém kalichu. K opylení dochází zpravidla hmyzem.(21)

Rostliny patřící do čeledi *Lamiaceae* obsahují značné množství silice (patří mezi tzv. siličné drogy). Tato čeleď má specifické žlázy „typu *Lamiaceae*“, které jsou místem akumulace silice. Hlavní součástí silice jsou monoterpeny (př. mentol a menton v *Mentha piperita* L., tymol v rodu *Thymus* atd.). Dalšími obsahovými látkami jsou di-, tri- a seskviterpeny a fenolické látky. V neposlední řadě obsahují rostliny také flavonoidy (př. luteolin, apigenin, diosmetin) a saponiny. Morfologie žlázek „*Lamiaceae*“ se liší mezi jednotlivými rostlinnými druhy, dokonce i v rámci jednotlivých druhů. Základní struktura je však jednotná. Žlázy se skládají z bazální buňky, krátké jednobuněčné stopky

a sekreční části. Sekreční část je tvořena různým počtem centrálních buněk, které jsou obklopeny buňkami periferními. Počet centrálních buněk se nejčastěji pohybuje od 4 – 8, počet periferních buněk je zpravidla několikanásobně vyšší. Tyto buňky jsou uspořádány do koncentrických kruhů, většinou do dvou (př. *Origanum*, *Satureja*) až do čtyř (př. *Ocimum*). (11,12,19)

Použití drog čeledi *Lamiaceae* je široké a závisí na množství a typu účinné látky v droze. Používají se např. jako karminativa a cholagoga (*Mentha piperita* L.). Řada z nich má antiseptický a antibakteriální účinek (*Salvia officinalis* L., *Thymus vulgaris* L.) a také účinek na CNS, často se používají do čajových směsí při migréně, bolestech hlavy, nespavosti apod. (*Melissa officinalis* L.). Několik druhů je i oblíbeným kořením.

3.2.2 Charakteristika jednotlivých studovaných druhů

***Betonica officinalis* L. (Bukvice lékařská)**



Anatomické znaky: Jedná se o víceletou drsně chlupatou rostlinu, která je vysoká 30 – 60 cm. Lodyha je zpravidla jednoduchá a na bázi zdřevnatělá. Dolní listy jsou v růžici, lodyžní listy jsou řapíkaté a úzce vejčité. Listy dosahují délky až 10 cm a jsou vroubkované. Květy mají červenou barvu a nachází se v hustém koncovém lichoklasu dlouhém 3–6 cm.

Doba květu: VII – VIII

Stanoviště: Střídavě vlhké louky, světlé lesy a křoviny. (3)

Obsahové látky: Bukvice obsahuje poměrně velké množství tříslovin (19%), dále malé množství silice a betainy (0,1 % - stachydrin, betonicin, turicin resp. cholin). Kromě těchto látek se zde nachází i iridoid harpagid a jeho acetát. Složením obsahových látek se velmi podobá čistci (*Stachys sp.*). (7)

Použití: Jako adstringens (díky značnému obsahu tříslovin), expektorans a antiastmatikum. Má i sedativní účinky a používá se k léčbě onemocnění močových cest a při katarrech žaludku. (1)

Nejedná se o lékopisnou drogu.

***Glechoma hederacea* L. (Popenec břechťanolistý)**

Anatomické znaky: Popenec je víceletá rostlina s plazivou, na uzlinách kořenující lodyhou,



kteřá může dorůstat délky 40–60 cm (většinou však bývá kratší). Listy jsou okrouhlovitě ledvinovité, vroubkované a až 3 cm široké. Na spodní straně jsou listy lesklé a naopak na vrchní straně jsou matně zelené. Modrofialové květy tvoří řídká květenství. Vyrůstají v úžlabí listenů a zdánlivě tvoří přesleny. Korunní trubka je dlouhá až 2 cm, tyčinky a čnělky ji přechnívají.

Doba květu: IV – VI

Stanoviště: Vlhké louky, lužní lesy, okraje lesů a křovin. Roste na půdách bohatých na dusík.(4)

Obsahové látky: Obsahuje hlavně třísloviny (6–7%), draselné soli, cholin. V menší míře se zde nacházejí saponiny, silice (0,3–0,6%), glechomin. Přítomny jsou i organické kyseliny např. kyselina rozmarinová, kyselina chlorogenová, kyselina 6-hydroxykávová a kyselina 6-hydroxyrozmarinová.(7,10,22)

Použití: Využívá se jako adstringens. Při léčbě plicních onemocnění, astmatu a v neposlední řadě při zánětu močových cest.(22)

Nejedná se o drogu lékopisnou.

***Hyssopus officinalis* L. (Yzop lékařský)**



Anatomické znaky: Vytrvalý polokeř 20 – 60 cm vysoký. Jeho stonky jsou přímé, listy jsou přisedlé a mají čárkovitě kopinatý tvar. Jsou poměrně tuhé, celokrajné, na okrajích podvinuté a téměř lysé. Květy mají modrofialovou barvu. Vyznačují se pravidelným kalichem a souměrností. Plody jsou tvrdky.

Doba květu: VI – VIII

Stanoviště: Yzop je domácí je Středomoří, ale i u nás se pěstuje.(3)

Obsahové látky: Rostlina obsahuje silici – hlavní

složkou je 1-pinokamfon (= 3-pinanon; 5,5 – 17,5%) a isopinokamfon (34,5 - 50%), obě sloučeniny patří mezi monoterpeny. Dalšími složkami silice jsou v menší míře seskviterpeny (α -pinen: 13,5 – 23%, limonen: 1 – 4% a sabinen: 2 – 3%). Přítomny jsou i fenoly (kyselina rozmarinová, kyselina 6-hydroxykávová), kyselina ursolová a kyselina oleanolová, třísloviny (asi 8%) a flavonoidy.(1,5)

Použití: Jedná se o centrálně působící antihydroitikum, expektorans a stomachikum. Používá se ve formě kloktadel. Silice má mírné antibakteriální účinky. Droga bývá taktéž složkou čajovin (diuretické, popříp. antirevmatické).(1)

Tato droga je lékopisná (ČL 2005, Evropská část)(20)

***Lamium album* L. (Hluchavka bílá)**

Anatomické znaky: Jedná se o 20 – 60 cm vysokou víceletou bylinu. Listy hluchavky jsou podobné listům kopřivy a jsou až 7 cm dlouhé. Květy tvoří lichopřesleny vyrůstající z úžlabí



listů. Barva je bílá, květy mají 2 – 2,5 cm dlouhou korunu s nahoru zahnutou trubkou a uvnitř se nachází věneček chloupků.

Doba květu: IV-VIII

Stanoviště: Můžeme ji nalézt na rumišťích, při okrajích cest, křovin. Roste na půdách bohatých na dusík.(4)

Obsahové látky: Rostlina obsahuje flavonoidy (glykosidy kvercetin a kempferolu), dále obsahuje triterpenické saponiny, třísloviny a jen stopy silice. Přítomný je i alkaloid stachydrin a

fenolická kyselina chlorogenová.(2,10)

Použití: Používá se jako mucilagosum, expektorans a adstringens. Dále se napomáhá při poruchách trávení nebo klimakterických obtížích. Externě se přikládá na otlaky.(2)

Droga nepatří mezi lékopisné.

Lavandula officinalis L. (Levandule lékařská)

Anatomické znaky: Levandule je polokeř 20 - 60 cm vysoký s přímými větvemi. Listy mají



křížmostojné postavení, jsou čárkovité a na okrajích podvinuté. Listy jsou na spodní straně běloplstnaté. Drobné květy světle modré barvy jsou v lichopřeslenech tvořících na vrcholu větve klas. Plody jsou lesklé tvrdky.

Doba květu: VIII – IX (X)

Stanoviště: Suché oblasti a projasněná místa.(3)

Obsahové látky: Levandule obsahuje silici (1 - 3%). Hlavními složkami silice jsou estery linaloolu (především linalylacetát) a linalool, méně pak obsahuje nerol, borneol a isoborneol,

geraniol, cineol a karyofylen. Kromě toho ještě obsahuje α -terpineol. Mimo silici jsou přítomny i třísloviny (do 12%), antokyany a fenolické kyseliny (kyselina rozmarinová a 6-hydroxykávová).(1,5,14)

Použití: Silice se používá jako dezinficiens, korigens vůně. Celá droga má sedativní účinek, působí jako mírné nervivum, využívá se při léčbě migrény a nespavosti. Kromě toho působí protikřečově a příznivě při žaludečních problémech.(1)

Droga je uvedena v lékopisu (ČL 2005, Evropská část) (20)

Leonurus cardiaca L. (Srdečník obecný)



Anatomické znaky: Jedná se o 50 - 150 cm vysokou víceletou rostlinu. Dolní listy jsou dlanité, lodyžní trojlaločné. Květy mají bílou barvu, zčásti mohou být bledě červené. Typický je chlupatý horní pysk a dolní pysk s purpurovou kresbou. Květy rostou v hustých mnohokvětých lichopřeslenech, přičemž se v květenství nachází listeny.

Jedná se o silně zapáchající rostlinu a u nás patří mezi ohrožené druhy.

Doba květu: VI – IX

Stanoviště: Nalézáme ji při okrajích cest, na rumišťích, u zdí a na svazích.(4)

Obsahové látky: Jsou zde poměrně široce zastoupeny iridoidy: ajugol, ajugosid, gluridosid, leonurid, reptosid a galiridosid. Kromě těch se zde nachází diterpeny: leocartin, leosibiricin, 19-hydroxygaleopsin a 19-acetoxypregaleopsin, dále oleanolovou kyselinu, ursolovou kyselinu, flavonoidní glykosidy a lipofilní flavonoidy (genkwanin). Z alkaloidů jsou přítomny stachydrin a betonicin.

Použití: Srdečník se používá v lidovém léčitelství při srdečních potížích a problémech s kardiovaskulárním systémem, déle v období klimakteria k mírnění menopauzálního syndromu.(7)

Droga nepatří mezi lékopisné.

***Marrubium vulgare* L. (Jablečník obecný)**

Anatomické znaky: 30 - 40 cm vysoká víceletá, šedoplstnatá rostlina. Stonek je přímý a



vůně jablečníku připomíná tymián. Listy jsou okrouhlé nebo široce srdčité, dále jsou řapíkaté, zubaté a na spodní straně hustě vlnatě chlupaté. Květy jsou asi 1,5 cm dlouhé s bílou korunou. Kalich je vlnatě chlupatý s 10 malými, nazpět ohnutými a na špičce lysými ušty. Květy rostou v hustých lichopřeslenech v úžlabí horních listů, celkově pak tvoří dlouhý listnatý lichoklas.

Jablečník řadíme mezi ohrožené druhy.

Doba květu: IV – VIII

Stanoviště: Roste na suchých pastvinách a stráních, při okrajích cest. Nalézt jej můžeme i na rumišťích a pustých místech.(4)

Obsahové látky: Rostlina obsahuje diterpenické hořčiny, hlavní je lakton marrubiín (0,3 - 1 %), potom marubenol, marubiol a jejich poloacetáty (nemají hořkou chuť). Dále obsahuje značné množství tríslovin (6 - 7%). V malém množství je zde přítomna silice (do 0,05%), saponiny a sliz. Z monoterpenů se zde vyskytují p-cymen, sabinen, α -pinen, limonen, p-fenchen a další.

Použití: Amarum, choleretikum a sekretolytické expektorans (zvyšuje sekreci bronchů).(1)

Patří mezi lékopisné drogy (ČL 2005, Národní část).(20)

Melissa officinalis L. (Meduňka lékařská)

Anatomické znaky: Meduňka je vytrvalá až 1 m vysoká bylina s větvitou lodyhou, která je hustě listnatá. Listy mají křížmostojné postavení a jsou vejčité srdčité s vroubkovaným, pilovitým okrajem. V úžlabí horních listů jsou chudé lichopřesleny bílých nebo bledě



modrých květů. Plody jsou tvrdky.

Doba květu: VII – VIII

Stanoviště: U nás se pěstuje pouze v kulturách.(3)

Obsahové látky: Je zde přítomna silice (0,03 - 0,3%), hlavně s obsahem alifatických monoterpenických aldehydů (40%): citral (geranial + neral: 30%; v proměnlivém množství, ale vždy v poměru 4:3), citronelal, citronelol, linalol. Dále jsou zde obsaženy seskviterpeny (α -karyofylen), glykosidicky vázaná kyselina chlorogenová, kyselina

6-hydroxykávová a kyselina rozmarinová. Také se zde nachází triterpenické kyseliny (kyselina oleanolová a ursulová), flavonoidy (kvercetin, rhamnocitrin a 7-glykosid apigeninu a luteolinu).(1,5)

Použití: Do přípravků se sedativním, spasmolytickým a antibiotickým účinkem. Užívá se při migréně, střevních a žaludečních potížích. Má i virostatické působení na herpes viry (způsobují opary na rtech a pásový opar).(1)

Droga je lékopisná (ČL 2005, Evropská část).(20)

Mentha crispa ROTH. (Máta kadeřavá)

Anatomické znaky: Jedná se o víceletou bylinu s 50 - 100 cm vysokou, červenoklasou lodyhou. Stonek je rozvětvený s křížmostojnými kopinatými, ostře a hluboce pilovitými listy. Květy jsou v úžlabí kopinatých listenů a vyrůstají v dlouhé přerušované klasy. Mají zvonkovitý tvar a zubatý kalich. Koruna je dvojpyskatá a má červenofialovou barvu. Plody jsou tvrdky.

Doba květu: VI – IX

Stanoviště: Je to rostlina velmi náročná na vlhko. U nás se pěstuje jen v kulturách.

Obsahové látky: Rostlina obsahuje silici (1-2%). Hlavní složku silice tvoří

karvon (40 - 66 %), dihydrokarveolacetát a dihydrokumylacetát. Podle původu může ještě obsahovat cineol, limonen nebo felandren. Z dalších látek se zde vyskytují třísloviny (do 6%), hořčiny a flavonoidy (diosmin, hesperidin).

Použití: Podobné jako u *Mentha piperita* L., ale v menším rozsahu.(22)

Droga není lékopisná.

***Mentha piperita* L. (Máta peprná)**

Anatomické znaky: Máta je vytrvalá bylina dosahující výšky 30 - 100 cm. Lodyha je přímá,



nahoře větvená. Listy mají křížmostojné postavení, jsou řapíkaté, vejčité kopinaté a nepravidelně ostře pilovité. Žilky na spodní straně listu jsou silně vystouplé. Květy mají fialovou barvu a nachází se v lichopřeslenech nahloučených v koncové klasy. Plody jsou tvrdky. Typická je pro mátu vůně mentolu.

Doba květu: VII - IX

Stanoviště: Můžeme ji nalézt na vlhkých místech (v příkopech, na březích). Ve volné přírodě však jen ojediněle.(3)

Obsahové látky: Obsahuje silici (0,5 - 4,0%). Podstatnou složku tvoří volný nebo esterově vázaný mentol (50 - 70%), menton (7 - 25%), mentofuran (2,5 - 5%), piperiton (= menten-3-on), cineol (4 - 6%), limonen (1 - 5%), karvon (do 1%) a další složky (př. jasmon 0,1 % - důležitý pro vůni). Velmi důležitý je obsah mentolu a jasmonu (zlepšují kvalitu silice) a mentofuranu (zhoršuje kvalitu silice). Dalšími přítomnými látkami jsou třísloviny (6 - 12%), flavonoidy, triterpeny a organické kyseliny.

Vlastní syntéza monoterpenů probíhá v mladých listech (převládá mentofuran). V starších listech dochází k sekundárním změnám a tvorbě mentolu a mentylacetátu.

Použití: Silice je chuťové korigens, stomachikum, choloretikum a cholagogum. Také má spasmolytické a antiseptické vlastnosti a používá se i v kosmetice a potravinářství.

Uplatňuje se i ve veterinární medicíně při poruchách trávení.(1,5)

Máta peprná patří mezi lékopisné drogy (ČL 2005, Evropská část).(20)

Nepeta cataria L. (Šanta kočičí)

Anatomické znaky: Šanta je 40 - 100 cm vysoká, přímá víceletá rostlina vonící po mátě. Lodyha je až k bázi krátce šedoplstnatě chlupatá. Podobně chlupaté jsou i vejčité nebo vejčité srdčité, 3-7 cm dlouhé listy. Listy jsou vroubkované, pilovité a řapíkaté. Koruna má



bělavou barvu, přičemž dolní pysk je červeně skvrnitý. Květy rostou v hustých okrouhlých lichoklasech. Kalich má dlouhé, špičaté a rovné ušty.

Doba květu: VI – IX

Stanoviště: Roste na okrajích cest, rumišťích, skalách a svazích.

Šanta patří mezi ohrožené druhy.(4)

Obsahové látky: Obsahuje silici (0,2 - 0,7%), v které je velké množství karvakuolu, dále nepetol, stopy tymolu, pulegonu a monoterpenů neznámého složení. Kromě silice obsahuje ještě

hořčiny, třísloviny a kyselinu rozmarinovou. V rostlině jsou přítomny i flavonoidy: genkwanin, cirsimaritin a 8-hydroxycirsimaritin.(10,17,22)

Nepeta cataria var. *citriodora* obsahuje 0,4% silice, kterou tvoří citral, citronelol, geraniol, nerol, limonen, menton a mentol, organické kyseliny a jejich estery (př. octová, máselná, valerová).

Použití: Jako nervivum, antiastmatikum. Podporuje menstruaci a trávení. Má antibakteriální, močopudné a cholagogní účinky. V neposlední řadě se používá i při katarrech dýchacích cest jako expektorans .

Droga nepatří mezi lékopisné.

Ocimum basilicum L. (Bazalka pravá)

Anatomické znaky: Jde o letničku s přímou, většinou lysou lodyhou, která dorůstá do výšky 30 cm. Lodyha je přímo větvená se stopkatými, vstřícnými listy. Listy mají vejčité až podlouhlý, na bázi celokrajný tvar a ve vyšších partiích jsou zastríhovaně zubaté. Horní listy přecházejí v malé, červenavé listeny. Květ je růžově fialový.

Doba květu: VI – IX

Stanoviště: Bazalka roste na velmi teplých a slunných místech.



Je to velmi aromatická rostlina.(4)

Obsahové látky: Silice (do 1,5 %) obsahuje 65 - 85 % estragolu (= metychavikolu), vedle toho malé množství cineolu, fencholu, linalolu a metyleugenolu. Některé chemotypy mohou obsahovat metylcinnamat, ocimen, pinen a kafr. Další přítomné látky jsou třísloviny (5%), kyselé saponiny, glykosidy, kyselina rozmarinová a flavonoidy (apigenin, genkwanin, salvigenin).

Použití: Při léčbě gastrointestinálních potíží (stomachikum, karminativum a

spasmolytikum).(5)

Bazalka nepatří mezi lékopisné drogy.

***Origanum vulgare* (Dobromysl obecná)**

Anatomické znaky: Dobromysl je víceletá aromatická rostlina tvořící husté porosty. Z oddenku vyrůstá 40 - 70 cm vysoká, již odspodu větvená lodyha, která je lehce ochlupená,



často s načervenalými větvemi. Listy jsou krátce řapíkaté, oválné nebo špičatě vejčité. Dále mohou být slabě zubaté nebo celokrajné, chlupaté nebo lysé. Červenavě růžová koruna má trojcípý dolní pysk a přímý, vykrojený pysk horní.

Doba květu: VII - IX (X)

Stanoviště: Můžeme ji nalézt na náspech, v suchých a světlých lesích, křovinách.(4)

Obsahové látky: Obsahuje 0,15 - 0,40% silice (v ní převládá karvakrol 16%, tymol a cymol).

Dalšími přítomnými látkami jsou třísloviny (do 8%), hořčiny, minerální látky a některé fenolické kyseliny (kyselina rozmarinová, kyselina 6-hydroxykávová a kyselina protokatechová).(1,10)

Použití: Používá se hojně jako koření. Dále jako sekretolytikum a spasmolytikum, karminativum a antiseptikum. Uplatňuje se při onemocnění dýchacích cest a revmatismu.(1)

Droga nepatří mezi lékopisné.

Prunella vulgaris L. (Černohlávek obecný)



Anatomické znaky: Jedná se o malou víceletou bylinu, dosahující výšky 10 - 15 cm s nadzemními plazivými výběžky. Lodyha je přímá nebo vystoupavá. Listy jsou slabě chlupaté a mají podlouhle vejčitý tvar, dosahují délky 4 cm a jsou celokrajné nebo slabě zubaté. Květy jsou modro fialové a tvoří okrouhlý nebo vejčitý lichoklas. Listeny a kališní lístky jsou purpurově zbarvené.

Doba květu: VI – IX (X)

Stanoviště: Černohlávek je hojně rozšířen a nalezneme jej ve světlých lesích, při okrajích cest nebo na mírně vlhkých loukách.(4)

Obsahové látky: Rostlina obsahuje třísloviny (7%), hořčiny, saponiny (aglykon tvoří kyselina oleanolová), dále obsahuje flavonoidy, stopy silice, glykosid aukubín. Přítomny jsou i fenolické kyseliny – kyselina rozmarinová, kyselina 6-hydroxyrozmarinová a kyselina 6-hydroxykávová.(7,10)

Použití: Používá se při zánětlivých onemocněních, při léčbě gynekologických problémů v kombinaci s jinými léčivými rostlinami (např. hluchavka bílá, levandule nebo rozrazil). Daná droga není lékopisnou.

Salvia officinalis L. (Šalvěj lékařská)

Anatomické znaky: Jde o polokeř s přímými, naspodu zdřevnatělými lodyhami. Šalvěj dorůstá do výšky 20 - 70 cm. Stonky jsou čtyřhranné a krátce větvené. Listy jsou dlouze řapíkaté, podlouhle vejčité nebo kopinaté a jemně vroubkované. Květy mají modrofialovou barvu, jsou poměrně velké a mají opadavé listence.

Doba květu: V – VIII

Stanoviště: Roste v kulturách.(3)

Obsahové látky: Obsahuje silici (0,5 - 2,5%), která se skládá z thujónu (35 - 60%), tj. směs α - a β -thujónu. Silice obsahuje ještě 20 % jiných monoterpenických látek. Další přítomné látky jsou seskviterpeny, triterpeny (odvozené od kyseliny oleanolové a jejich derivátů), hořčiny diterpenového typu (karnosol = pikrosalvin, rosmanol, epirosmanol, salvin atd.).



Jsou zde přítomné i třísloviny (3 - 7%), flavonoidy (1 - 3%). Z flavonoidů to jsou deriváty luteolinu a apigeninu, genkwaninu, cirsimaritinu. Zajímavý je i obsah thiaminu a kyseliny nikotinové (příp. jejího amidu). Nacházíme zde i fenolické kyseliny – kyselina kávová, chlorogenová a kyselina rozmarinová.(1,5,10)

Použití: Antiflogistikum při zánětech dutiny ústní, hltanu, při gingivitidě a stomatitidě, převážně ve formě kloktadel. Je součástí čajovin používaných při poruchách trávení, nadýmání. Hojně se používá jako složka kosmetických přípravků

(zubní pasty, mýdla, pleťové vody atd.).(1)

Šalvěj lékařská patří mezi lékopisné drogy (ČL 2005, Evropská část).(20)

Salvia pratensis L. (Šalvěj luční)

Anatomické znaky: Šalvěj je až 80 cm vysoká, víceletá rostlina. Lodyha je chlupatá,



nahoře žláznatě chlupatá. Lodyhy jsou duté. Listy mají vejčitý tvar, jsou nepravidelně vroubkované a až 12 cm dlouhé. Květy mohou být tmavě modré a modrofialové, zřídka bývají růžové. Trubka je 1,5-2,5 cm dlouhá (3x delší než nepravidelně zubatý kalich) a má srpovitě zahnutý kalich.

Doba květu: V – VIII

Stanoviště: Roste na suchých loukách.(4)

Obsahové látky: Z fenolických látek jsou přítomny flavony (apigenin, luteolin a diosmetin), dále byla zjištěna přítomnost organických kyselin

(kyselina rozmarinová a kyselina 6-hydroxykávová).(10,13)

Použití: Šalvěj luční nemá žádné podstatné využití ani v lidovém léčitelství.

Nejedná se o lékopisnou drogu.

***Satureja montana* L. (Saturejka horská)**

Anatomické znaky: Vytrvalá rostlina, která má, narozdíl od *Satureja hortensis*, kožovité listy a v daleko větším počtu případů bílé květy. Taktéž je méně aromatická, jinak svým vzhledem odpovídá popisu *S. hortensis* L. (22)

Doba květu: VI – IX

Stanoviště: Pěstuje se v kulturách.

Obsahové látky: Silice obsahuje hlavně karvakrol (až 80%), cymol, p-cymen a v některých případech thymol. Dále obsahuje třísloviny (asi 9%) a sliz, kyselinu oleanolovou a krategolovou, fenolické kyseliny (kyselinu rozmarinovou a kyselinu 6-hydroxykávovou) a tymohydrochinon (má difenolický charakter). (10,22)

Použití: Shodné s *S. hortensis* L., taktéž se nejedná o lékopisnou drogu

***Satureja hortensis* L. (Saturejka zahradní)**

Anatomické znaky: Jednoletá bylina s 10 - 30 cm vysokou lodyhou. Stonek je rozvětvený



s téměř sedícími listy, které jsou čárkovitě kopinaté a celokrajné. Květy mají srostené obaly. Mají zvonkovitý kalich s fialovou, růžovou nebo bílou paprscitou korunou. Koruna má kratší horní a delší dolní pysk. Plody jsou tvrdky.

Doba květu : VI – IX

Stanoviště: Pěstuje se v kulturách. (4)

Obsahové látky: Obsahuje silici (0,16 - 2,0%). Složkami silice jsou karvakrol (30%), cymol (20%), borneol, cineol, pinen a další terpeny (někdy se může vyskytovat i thymol). Přítomny

jsou i třísloviny (4 - 9%) a malé množství slizu. (10,22)

Použití: Jako stomachikum, při onemocnění žaludku. Má adstringentní a mírné antiseptické vlastnosti. Působí proti nadýmání, žaludečním křečím a katarům dýchacích cest. V potravinářství se používá jako koření.

Droga není lékopisná.

***Thymus serpyllum* L. (Mateřídouška úzkolistá)**

Anatomické znaky: Mateřídouška dosahuje výšky 30 cm. Kvetoucí lodyhy jsou okrouhlé



až čtyřhranné, které jsou lysé na hranách nebo celé chlupaté. Větve jsou polehající a mohou kořenit. Listy jsou obvykle vejčité, celokrajné. Květy mohou být růžové až purpurově fialové. Nachází se ve strboulovitě shloučených lichopřeslenech.

Doba květu: V – X

Stanoviště: Roste na suchých slunných místech, v písčitých a světlých hájích teplých oblastí. Rostlina zpravidla tvoří husté porosty.(3)

Obsahové látky: Obsahuje asi 0,1 - 0,6% silice, která má velmi proměnlivé složení podle taxonu. V silici převládá tymol, případně karvakrol nebo citral (dohromady tvoří až 50% podílu silice). Může se vyskytovat i linalool, terpineol a někdy borneol. Další obsahové látky jsou třísloviny (asi 7%), hořčiny neznámého složení a flavonoidy.(1,10)

Použití: Expektorans, bronchospasmolytikum a antiseptikum. Má i antibiotické a antiseptické vlastnosti. Je součástí čajovin a bylinných koupelí. Používá se i jako koření.(1)
Mateřídouška není lékopisnou drogou.

***Thymus vulgaris* L. (Tymián obecný)**



Anatomické znaky: Jedná se o silně větovitý polokeř dorůstající až 30 cm. Větve jsou přímé a čtyřhranné. Listy mají čárkovitý a kopinatý tvar, na okrajích jsou mírně podvinuté. Květy mají fialovou barvu. A chudé lichopřesleny malých květů jsou ve vrcholových hlávkách.

Doba květu: V – X

Stanoviště: Můžeme jej nalézt na slunných místech, ve světlých hájích teplých oblastí.(3)

Obsahové látky: Silice (1,0 - 2,5%), jejíž hlavní

složkou jsou fenoly: tymol (30 - 70%) a karvakrol (3 - 15%). Dalšími monoterpeny, vyskytujícími se v menší míře, jsou p-cymol a limonen. Jsou zde přítomny i triterpeny, fenolické kyseliny, flavonoidy (luteolin, apigenin a jejich deriváty) a třísloviny (do 10%).(1,15)

Použití: Jako expektorans, bronchospasmolytikum (léčba akutní a chronické bronchitidy). Má antiseptické a antibiotické účinky. Jako kloktadlo se používá při zánětech dutiny ústní. Využití má i jako přísada do koupelí a bylinných obkladů.(1)
Daná droga je lékopisná (ČL 2005, Evropská část)(20)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál, chemikálie a potřeby

Materiál:

Materiál k histochemickým důkazům tvořily listy 20 druhů rostlin čeledi *Lamiaceae*. Z jednotlivých rostlinných druhů byly odebrány čerstvé listy. Odebíraly se vždy tři listy z jedné rostliny. Jednalo se o vzorky listů, které nebyly poškozené a znečištěné.

Všechny vzorky po celou dobu pozorování byly sbírány v Zahradě léčivých rostlin farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Rostlinné druhy použité k důkazu byly následující:

- Betonica officinalis* L. (Bukvice obecná) - *lékárnická*
- Glechoma hederacea* L. (Popenec břechřanolistý) *obecný*
- Hyssopus officinalis* L. (Yzop lékařský)
- Lamium album* L. (Hluchavka bílá)
- Lavandula officinalis* L. (Levandule lékařská)
- Leonurus cardiaca* L. (Srdečník obecný)
- Marrubium vulgare* L. (Jablečník obecný)
- Melissa officinalis* L. (Meduňka lékařská)
- Mentha crispa* ROTH. (Máta kadeřavá)
- Mentha piperita* L. (Máta peprná)
- Nepeta cataria* L. (Šanta kočičí)
- Ocimum basilicum* L. (Bazalka pravá)
- Origanum vulgare* L. (Dobromysl obecná)
- Prunella vulgaris* L. (Černohlávek obecný)
- Salvia officinalis* L. (Šalvěj lékařská)
- Salvia pratensis* L. (Šalvěj luční)
- Satureja hortensis* L. (Saturejka zahradní)
- Satureja montana* L. (Saturejka horská)
- Thymus serpyllum* L. (Mateřídouška úzkolistá)
- Thymus vulgaris* L. (Tymián obecný)

Listy byly sbírány v období od konce dubna do poloviny října. Sběr probíhal v týdenních intervalech až do konce června, poslední sběr proběhl v říjnu. Z každé rostliny bylo tedy odebráno 11 vzorků.

Data jednotlivých sběrů:

1. sběr 28.4. – vzorky byly zpracovány ihned
2. sběr 6.5. - vzorky byly zpracovány ihned
3. sběr 13.5. – vzorky byly zpracovány ihned
4. sběr 20.5. – vzorky byly zpracovány ihned
5. sběr 26.5. – vzorky byly zpracovány ihned
6. sběr 2.6. – vzorky byly uchovány v mrazničce a zpracovány 11.6.
7. sběr 10.6. – vzorky byly uchovány v mrazničce a zpracovány 11.6.
8. sběr 17.6. – vzorky byly uchovány v mrazničce a zpracovány 29.6.
9. sběr 23.6. – vzorky byly uchovány v mrazničce a zpracovány 29.6.
10. sběr 29.6. – vzorky byly zpracovány ihned
11. sběr 6.10. – vzorky byly zpracovány ihned

Materiál byl hodnocen bezprostředně po sběru, a to u sběrů č. 1, 2, 3, 4, 5, 10 a 11. Vzorky nasbírané ve zbývajících sběrech, sběr č. 6, 7, 8 a 9, byly před provedením histochemického důkazu zmrazeny.

Chemikálie:

0,05 % roztok 4-nitrosofenolu v koncentrované H_2SO_4

Přístroje:

Stereomikroskop CARLZEISS JENA (Německo)

Pomůcky:

Sada podložních a krycích mikroskopických sklíček

Kapátko

Pinzeta

4.2 Provedení histochemického důkazu

Na vzorek listu, který byl umístěn na podložním sklíčku, byla nanesena jedna nebo dvě kapky indofenolového činidla tak, aby se dané činidlo rozteklo po celém vzorku listu. Poté se vzorek přikryl krycím sklíčkem a pozoroval pod stereomikroskopem.

Histochemický důkaz byl prováděn na spodní i svrchní straně listů. Průběh reakce byl sledován jako barevná změna žlázek na listech. Pozitivní reakce na přidané činidlo se projevovala červeným nebo zeleným zbarvením žlázek.

5. VÝSLEDKY

U některých preparátů proběhla reakce ihned po nanesení činidla a byla viditelná pouhým okem, především když výsledkem reakce byly červeně zbarvené reakční produkty. U některých listů reakce proběhla přibližně za jednu nebo dvě minuty.

Rostlinné druhy, u nichž proběhla reakce ihned:

- *Betonica officinalis* L.
- *Glechoma hederacea* L.
- *Lavandula officinalis* L.
- *Marrubium vulgare* L.
- *Melissa officinalis* L.
- *Mentha crispa* ROTH.
- *Salvia officinalis* L.
- *Satureja hortensis* L.
- *Satureja montana* L.
- *Thymus serpyllum* L.
- *Thymus vulgaris* L.

Rostlinné druhy, u nichž probíhala reakce s činidlem se zpožděním:

- *Hyssopus officinalis* L.
- *Leonurus cardiaca* L.
- *Nepeta cataria* L.
- *Ocimum basilicum* L.
- *Origanum vulgare* L.
- *Salvia pratensis* L.

Betonica officinalis L. (Bukvice lékařská)

Při prvním histochemickém testu došlo ve žlázkách na spodní i svrchní straně listu k reakci, reakce proběhla velmi rychle. Zbarvení žlázek po obou stranách bylo červené a jejich počet, na ostrůvku ohraničeném žilnatinou, byl dvacet. Daná reakce proběhla rovnoměrně po celé ploše listu, přičemž se zbarvila naprostá většina žlázek. Při druhém sběru byla situace totožná.

U třetího sběru byla pozorována změna v reakci. Opět vzniklo červené zbarvení ve žlázkách z obou stran listu, ale zbarvily se pouze některé. Počet reagujících žlázek poklesl na pět, ty jsou pak náhodně rozmístěny po celé ploše listu. Obdobná je i situace u

následujících dvou sběrů.

Další významná změna v pozorování nastává u šestého sběru na začátku června, kdy pozorovaná rostlina začíná kvést. Při provádění histochemického testu nedochází k žádné reakci žlázek s daným činidlem, reakce je negativní.

Souhrn: U mladých listů byly patrná téměř celková reakce žlázek s přidávaným činidlem, postupně se stárnutím listu však reagujících žlázek ubývá až do úplného vymizení reakce (tab.1).

Glechoma hederacea L. (Popenec břečťanolistý)

Popenec byl na začátku pozorování ve stádiu kvetení (během prvních třech sběrů). Ve čtvrtém sběru byla již testovaná rostlina po odkvětu.

Od začátku pozorování až po devátý sběr byla situace stejná. U popence v této fázi docházelo k rozdílné reakci na spodní a svrchní straně listu. Zatímco na svrchní straně listu nedocházelo k žádné reakci, na spodní straně listu naopak došlo k zbarvení všech žlázek, reagující žlázy měly červenou barvu. Přičemž počet reagujících žlázek na ostrůvku byl 50 – 60. Reakce žlázek na podané činidlo byla velmi rychlá a viditelná již pouhým okem.

Ke změně došlo až u posledních dvou sběrů. Na spodní straně listu reagovala většina žlázek na činidlo červeně (tj. asi 40 – 45 žlázek na ostrůvku), ale zbylé vykazovaly zelenou reakci na přidávané činidlo. Na svrchní straně docházelo taktéž ke změně, reakce žlázek na přidané činidlo se projevila červeným zbarvením, reagovaly všechny žlázy.

Souhrn: Nejprve docházelo k červenému zbarvení žlázek pouze na spodní straně listu, později se však reakce mění a na přidávané činidlo reagovaly červeným zbarvením i žlázy na svrchní straně listu. Současně docházelo ke změně i na spodní straně listu a některé žlázy se po reakci s činidlem zbarvily zeleně (tab.1).

Hyssopus officinalis L. (Yzop lékařský)

Až do třetího sběru nedocházelo k žádné barevné reakci s činidlem. Reakce byla pozorována u starších listů. Pouze na svrchní straně listu docházelo k zbarvení některých žlázek v počtu 8 - 12. Tyto žlázy se zbarvily zeleně, k červenému zbarvení vůbec nedocházelo. Nejvíce reagujících žlázek bylo podél středové žilnatiny, pak se nacházely spíše na špičce listu.

Při devátém sběru yzop kvetl a byla patrná další změna. Žlásky reagovaly stále za vzniku zeleného zbarvení, ale reakce probíhala již na obou stranách. Opět reagovaly jen některé žlásky, které byly náhodně rozmístěny po celé ploše listu.

Při posledním testu (yzop byl již po odkvětu) docházelo k červené reakci ve žlázkách, vůbec nevznikalo zelené zbarvení. Reakce proběhla asi u 1/3 žlázek, zbarvené žlásky jsou opět náhodně rozmístěny po ploše listu.

Souhrn: Po období, kdy žlásky nedávaly žádnou reakci, docházelo k barevné reakci projevující se zeleným zbarvením (nejdříve na svrchní straně listu, následně na obou stranách). Po odkvětu rostliny byla pozorováno jen červené zbarvení na obou stranách listu (tab.1).

***Lamium album* L. (Hluchavka bílá)**

Hluchavka na začátku pozorování kvetla, až desátý sběr byl po odkvětu rostliny.

Během celé doby pozorování a provádění histochemických testů nebyly zaznamenány žádné změny. Žlaznaté trichomy vůbec nereagovaly na přidávané indofenolové činidlo.

Souhrn: Ve žlázkách nedocházelo k žádné reakci.

***Lavandula officinalis* L. (Levandule lékařská)**

K reakci žlázek docházelo ihned. Při prvním pozorování docházelo k stejné reakci na obou stranách listu. Červeně reagující žlásky se nacházely nejvíce na špičce listu popř. při okrajích listu. K podobné situaci došlo i při druhém testu.

Při třetím pozorování se červené žlásky nacházely náhodně po celé ploše listu. Znovu docházelo k zbarvení necelé poloviny žlázek jako při prvních dvou testech.

U čtvrtého pozorování byla pozorována reakce jen několika žlázek, které byly rozesety po celé ploše listu. Tento stav přetrvával až do osmého sběru.

Od devátého sběru levandule kvetla a došlo k podstatné změně. Reakci s činidlem podléhaly všechny žlásky na spodní i svrchní straně listu, reakce vedla stále k červenému zbarvení. I po následující dvě pozorování byl stav stejný.

Souhrn: U levandule se reagující žlásky zbarvily pouze červeně, přičemž se během vývoje listů zvyšoval počet reagujících žlázek z ojedinelé reakce na špičce a okrajích listu

po barevnou reakci na celé ploše listu (tab.1).

***Leonurus cardiaca* L. (Srdečník obecný)**

Po nanesení činidla bylo nutné chvíli počkat (přibližně 2 min) než reakce proběhla. Od prvního do čtvrtého pozorování byla reakce stále stejná. Žlázy reagovaly na činidlo červeným zbarvením. Reakce probíhala jen u několika žlázek (na ostrůvku pouze 15 -20 žlázek z celkového počtu 35 - 40). Reagující červené žlázy se nacházely náhodně po ploše listu. K reakci docházelo stejně na spodní i svrchní straně listu.

Při pátém sběru dochází k zbarvení všech žlázek (počet na ostrůvku 35 - 40), přičemž je stejná reakce na spodní i svrchní straně listu.

K další změně došlo až při desátém sběru. Rozdílně reagovaly žlázy na spodní a svrchní straně listu. Na svrchní straně nedocházelo k žádné reakci s činidlem, naopak na spodní straně se po přidání činidla zbarvily všechny žlázy červeně. Tento stav byl zaznamenán i při posledním sběru, kdy byla rostlina po odkvětu.

Souhrn: Žlázy reagovaly červeným zbarvením, nejdříve pouze některé, ale později všechny. Reakce probíhala na obou stranách listu, později se červeně barvily jen žlázy na spodní straně listu (tab.1).

***Marrubium vulgare* L. (Jablečník obecný)**

Reakce s činidlem probíhala ihned. Při prvních dvou testech bylo pozorováno červené zbarvení většiny žlázek na obou stranách listu. Žlázy byly rozmístěny rovnoměrně po celé ploše listu.

Výrazná změna nastala u třetího sběru. Docházelo k zbarvení všech žlázek na obou stranách, reakce vedla k zelenému zbarvení, které převládá nad červeným. Poměr zeleně a červeně zbarvených žlázek je 30 : 20. Po následující testy stále převládalo zelené zbarvení nad červeným.

Později, u vzorku z osmého sběru, proběhla nepatrná změna. Na spodní straně listu stále docházelo k reakci projevující se zeleným i červeným zbarvením (poměr je 25 : 13). Ale na svrchní straně téměř nedocházelo ke tvorbě červených reakčních produktů a naprostá většina žlázek se zbarvila zeleně. Tento stav se již více neměnil ani po odkvětu rostliny.

Souhrn: Nejprve docházelo pouze k červenému zbarvení ve žlázkách na obou stranách listu. Pak nastala výrazná změna, zeleně zbarvené žlázy převažovaly nad

červenými, zprvu na obou stranách listu stejně. Později na svrchní straně listu nedocházelo k téměř žádné reakci projevující se červeným zbarvením (tab.1).

***Melissa officinalis* L. (Meduňka lékařská)**

K reakci docházelo ihned po nanesení činidla. Od prvního sběru se zbarvovaly všechny žlázy červeně na spodní i svrchní straně listu. Počet reagujících žlázek na ostrůvku byl 10 - 15.

Při šestém sběru došlo ke změně, rostlina v tomto období začínala kvést. Na spodní straně listu bylo stále patrné červené zbarvení všech nebo alespoň většiny žlázek. Na svrchní straně téměř nedocházelo k reakci s činidlem.

Při desátém sběru (meduňka byla již po odkvětu) nedocházelo na svrchní straně listu k žádné reakci a na spodní straně listu se počet reagujících žlázek snížil přibližně na 1/3. Reagující žlázy se vyskytovaly spíše při okrajích listu.

Souhrn: Zprvu reagovaly všechny žlázy na spodní i svrchní straně listu. Později se počet velmi snížil, na svrchní straně listu až na nulu. Na spodní straně listu nejdříve nebyla patrná změna, později se však i zde počet červených žlázek snižuje (tab.1).

***Mentha crispa* ROTH. (Máta kadeřavá)**

Reakce s činidlem probíhala ihned. Již od prvního sběru docházelo u rostliny k červené reakci žlázek s činidlem. Na spodní i svrchní straně listu došlo k zbarvení naprosté většiny žlázek (počet reagujících žlázek na ostrůvku byl dvacet pět). Rozmístění reagujících žlázek bylo rovnoměrné po celé ploše listu. Tento stav přetrvával do šestého sběru.

Při šestém sběru zůstávala na spodní straně listu situace stejná, ale na svrchní straně listu se objevilo několik zeleně zbarvených žlázek (jejich počet byl čtyři).

V dalších sběrech stále převládalo červené zbarvení na spodní straně listu, ale vyskytovaly se zde i zeleně reagující žlázy. Na svrchní straně listu docházelo k tomu, že postupně převládaly zelené žlázy nad červenými.

U osmého sběru byla patrná mírná změna (rostlina kvetla). Na spodní straně byla reakce stále stejná, ale na svrchní straně dochází k mírné změně. Nevyskytovalo se zde žádné červené zbarvení a jen některé žlázy byly zbarveny zeleně.

Souhrn: Zpočátku docházelo pouze k červenému zbarvení žlázek na spodní i svrchní

straně listu. Později se objevovaly i zeleně zbarvené žlázy (červené zbarvení převládalo). Na svrchní straně postupně docházelo ke změnám od objevení se zelené barvy, přes úbytek červeného zbarvení až po vymizení červené reakce, kdy zůstalo jen několik žlázek zelených (tab.1).

***Mentha piperita* L. (Máta peprná)**

Po celou dobu provádění testů, ani během květu nebo po odkvětu rostliny, nebyla pozorována žádná reakce žlázek s indofenolovým činidlem.

Souhrn: Na žlázkách nedocházelo k žádné reakci.

***Nepeta cataria* L. (Šanta kočičí)**

Nejprve, tj. během prvních dvou sběrů, bylo pozorováno červené zbarvení žlázek při nanesení činidla. Reakce probíhala velmi omezeně, jen několik žlázek zčervenalo (počet žlázek byl pět). Žlázy byly rozmístěny náhodně po celé ploše listu na obou stranách.

Od třetího sběru nedocházelo k žádné reakci žlázek s přidávaným činidlem. Tento stav se již neměnil, ani po dobu květu rostliny.

Souhrn: Nejprve ojediněle reagovaly žlázy červeným zbarvením, následně však reakce zcela vymizely (tab.1).

***Ocimum basilicum* L. (Bazalka pravá)**

Po přidání činidla bylo nutné počkat asi 2 min než proběhne reakce. Při prvních testech docházelo k červenému zbarvení žlázek na obou stranách listu. K reakci došlo pouze u žlázek nacházejících se u řapíku. Na zbylé ploše listu byla patrná jen ojedinělá pozitivní reakce na činidlo. Tento stav přetrvával poměrně dlouhou dobu.

U pátého sběru došlo ke změně, rostlina začínala kvést. Žlázy bazalky nereagovaly na přidávané činidlo a nedocházelo k žádné reakci.

Další změna nastala až u osmého sběru, tehdy se objevila zelená reakce žlázek. Toto zbarvení probíhalo jen u několika žlázek náhodně rozestých po ploše listu (počet reagujících žlázek byl pět). Na spodní i svrchní straně probíhala reakce analogicky. Tato situace se již více neměnila, ani v době květu a po odkvětu rostliny.

Souhrn: Nejprve docházelo k omezené reakci žlázek vedoucí k červeně zbarveným

reakčním produktům v blízkosti řapíku na obou stranách listu. Pak vůbec nedocházelo k reakci na činidlo a nakonec probíhal jen omezená reakce žlázek, které se barvily zeleně (tab.1).

***Origanum vulgare* L. (Dobromysl obecná)**

Ke zbarvení žlázek došlo až po určité době od nanesení činidla, proto bylo nutno počkat asi 1 minutu. Reakce s činidlem vedla k zelenému zbarvení všech žlázek na obou stranách listu. Tato situace přetrvávala až do desátého sběru. Reakce probíhala analogicky na obou stranách listu. V dalších sběrech se zbarvovaly všechny žlázy nebo naprostá většina z nich.

Při desátém sběru dobromysl kvetla a docházelo k malé změně počtu reagujících žlázek na spodní i svrchní straně listu. Zeleně zbarvené žlázy se vyskytovaly spíše při okrajích listu a na jeho špičce. Stejná byla i situace při posledním pozorování.

Souhrn: Žlázy rostliny reagovaly pouze zeleným zbarvením, přičemž se během doby pozorování měnil pouze počet reagujících žlázek. Reakce probíhala stejně na spodní i svrchní straně listu (tab.1).

***Prunella vulgaris* L. (Černohlávek obecný)**

Během pozorování žlázy nereagovaly na přidávané činidlo. Na reakci neměl vliv ani růst rostliny a její vegetační období.

Souhrn: Na žlázkách nedocházelo k žádné reakci.

***Salvia officinalis* L. (Šalvěj lékařská)**

K reakci docházelo ihned po nanesení činidla. Jen málo žlázek se zbarvilo červeně (počet zbarvených žlázek byl 1 nebo žádná z celkového počtu 7 – 10 žlázek na ostrůvku). Žlázy byly náhodně rozmístěny po ploše listu, na spodní i svrchní straně listu stejně. Tato situace byla stejná ještě po následující dva sběry.

U čtvrtého sběru nedocházelo k žádné reakci mezi žlázkami a činidlem. Rostlina v tomto období kvetla.

Reakce se měnila až při devátém sběru. Všechny žlázy na spodní straně reagovaly zeleným zbarvením (počet zeleně zbarvených žlázek byl osm), na svrchní straně byl počet

reagujících žlázek o málo menší. Zbarvené žlásky byly na obou stranách rovnoměrně rozmístěny po ploše listu. V následujících sběrech ubývalo počtu reagujících žlázek, ale jejich zbarvení zůstávalo stále zelené (počet reagujících žlázek se snížil na 1 – 3 na ostrůvku).

Souhrn: Nejprve docházelo k omezené reakci a vzniku červených žlázek. Následně žlásky nereagovaly vůbec. A v poslední fázi probíhala zelená reakce, kdy se postupně snižoval počet reagujících žlázek (tab.1).

Salvia pratensis L. (Šalvěj luční)

Před pozorováním bylo nutno počkat asi 2 min po nanesení činidla. Červeně zbarvené žlásky se nacházely především u řapíku a při okrajích listu. Některé žlásky byly i uprostřed listu, ale bylo jich minimum. Na spodní i svrchní straně listu byla situace stejná.

Při třetím sběru začínala rostlina kvést. Velmi ojediněle teď vznikalo červené zbarvení, zbarvené žlásky se nacházely spíše u řapíku listu.

Při pátém pozorování došlo ke změně, na spodní straně stále reagovalo nepatrné množství žlázek, ale na svrchní straně listu nedošlo k žádné reakci. Stav byl stejný po celou dobu pozorování.

Souhrn: U šalvěje docházelo pouze k červené reakci ve žlázkách. Reagujících žlázek bylo poměrně málo. Během pozorování se měnilo jen jejich rozmístění na ploše listu. Následně docházelo k vymizení pozitivní reakce na svrchní straně (tab.1).

Satureja hortensis L. (Saturejka zahradní)

Reakce probíhala ihned po nanesení činidla. Docházelo k zbarvení naprosté většiny žlázek na spodní i svrchní straně listu. Reakce s činidlem vedla k zelenému zbarvení, reagující žlásky se nacházely po celé ploše listu. V následujících testech již docházelo k zbarvení všech přítomných žlázek. Červená reakce v tomto období vůbec neprobíhala.

Při sedmém pozorování došlo ke změně, saturejka kvete. Na spodní straně listu byly zbarveny všechny žlásky zeleně, ale na svrchní straně listu se zbarvily pouze některé. Reakci na svrchní straně podléhaly spíše žlásky při okrajích listu, zbarvily se i žlásky uprostřed plochy (je jich menšina). Na reakci žlázek s činidlem se již do konce pozorování nic nezměnilo.

Souhrn: U saturejky docházelo pouze k zelené reakci. Nejprve byl stav stejný na obou stranách listu (docházelo k zbarvení všech žlázek). Potom se změnila reakce na svrchní straně listu, kde se počet reagujících žlázek snížil (tab.1).

Satureja montana L. (Saturejka horská)

Reakce probíhala ihned po přidání činidla na vzorek. Docházelo ke dvou reakcím. Proběhlo zbarvení žlázek do červena, těchto žlázek je minimální počet, tj. 4 – 5 na celé ploše listu. Zbývá většina žlázek se zbarvila zeleně. Celkově reagovaly všechny žlázy. Stav byl stejný na spodní i svrchní straně listu.

Od druhého sběru nedocházelo k červené odpovědi na přidávané činidlo. Zbarvily se všechny žlázy, ale pouze zeleně. Tato reakce se po delší dobu neměnila.

Změna reakce nastala až po odkvětu rostliny, tj. při jedenáctém sběru. Na spodní straně došlo ke zbarvení většiny žlázek zeleně, přičemž byly žlázy rovnoměrně rozloženy po celé ploše listu. Na svrchní straně došlo k reakci, která vedla k červenému zbarvení většiny žlázek, taktéž rovnoměrně rozptýlených po ploše listu.

Souhrn: Nejprve probíhala reakce vedoucí k červenému i zelenému zbarvení žlázek na listu. Následně byla patrná jen zelená reakce na obou stranách listu. Stav se měnil až po odkvětu rostliny. Na svrchní straně listu probíhala reakce vedoucí k červenému zbarvení žlázek a na spodní straně listu k zelenému zbarvení (tab.1).

Thymus serpyllum L. (Mateřídouška úzkolistá)

Reakce probíhala ihned po nanesení nitrosufenolu. Vznikalo červené zbarvení všech přítomných žlázek, počet je 10 – 15. Na spodní i svrchní straně listu byla situace stejná.

Při druhém pozorování reagovaly žlázy červeným zbarvením jen minimálně, více žlázek podléhalo reakci s činidlem, při které reagují žlázy zeleným zbarvením. Na obou stranách listu byl průběh reakce stejný.

Při třetím sběru se všechny žlázy na svrchní straně zbarvily zeleně. Na spodní straně pak docházelo k červenému zbarvení, ale spíše se zbarvovalo okolí žlázek než žlázy samy. Tato situace se delší dobu neměnila.

Až při osmém sběru došlo opět ke změně. Na svrchní straně se většina žlázek zbarvila zeleně, na spodní straně nedocházelo téměř k žádné reakci. Tento stav přetrvával déle.

Po odkvětu rostliny, tj. při jedenáctém sběru, se stav opět měnil. Na spodní i svrchní

straně listu reagovala naprostá většina žlázek červeně.

Souhrn: Zpočátku docházelo u mateřídoušky jen k červenému zbarvení žlázek. Potom se objevovalo spolu s červeným i zelené zbarvení žlázek. Žlásky reagovaly rozdílně na spodní a svrchní straně listu. Po odkvětu rostliny se objevovalo jen červené zbarvení žlázek (tab.1).

Thymus vulgaris L. (Tymián obecný)

Ihned vznikalo červené zbarvení všech žlázek na obou stranách listu.

Při druhém pozorování převládala na spodní straně listu červená reakce s činidlem, ale na svrchní straně listu převládalo zelené zbarvení. Reagovaly téměř všechny žlásky, které byly náhodně rozesety po celé ploše listu.

U třetího sběru červené zbarvení již nevznikalo. Na obou stranách měly reagující žlásky zelenou barvu, reagovaly všechny. Při čtvrtém sběru rostlina kvetla, ale reakce žlázek se od předchozího pozorování neměnila.

Po odkvětu, tj. při jedenáctém sběru, došlo ke změně. Na spodní i svrchní straně listu docházelo pouze k reakci projevující se vznikem červeně zbarvených reakčních produktů, přičemž se zbarvily všechny žlásky.

Souhrn: U tymiánu reagovaly žlásky zeleně i červeně a reakci podléhaly všechny. Žlásky reagovaly rozdílně na spodní a svrchní straně listu. Na závěr probíhala pouze reakce vedoucí k červenému zbarvení žlázek (tab.1).

	1 sběr	2 sběr	3 sběr	4 sběr	5 sběr	6 sběr	7 sběr	8 sběr	9 sběr	10 sběr	11 sběr
Ocimum basalicum	čv min	čv min	čv min	čv min	—	—	—	zl ↑ (5)	zl (5)	zl (5)	zl (5)
Origanum vulgare	čv min	čv min	čv min	čv min	—	—	—	zl ↑ (5)	zl (5)	zl (5)	zl (5)
Salvia officinalis	čv min	čv min	čv min	čv min	—	—	—	zl ↑ (5)	zl (5)	zl (5)	zl (5)
Salvia pratensis	čv min	čv min	čv min	čv min	—	—	—	zl ↑ (5)	zl (5)	zl (5)	zl (5)
Satureja hortensis	čv min	čv min	čv min	čv min	—	—	—	zl ↑ (5)	zl (5)	zl (5)	zl (5)
Satureja montana	čv min	čv min	čv min	čv min	—	—	—	zl ↑ (5)	zl (5)	zl (5)	zl (5)
Thymus serpyllum	čv min	čv min	čv min	čv min	—	—	—	zl ↑ (5)	zl (5)	zl (5)	zl (5)
Thymus vulgaris	čv min	čv min	čv min	čv min	—	—	—	zl ↑ (5)	zl (5)	zl (5)	zl (5)

čv...červené zbarvení

zl.....zelené zbarvení

↑.....zvýšení počtu reagujících žlázek

↓.....snížení počtu reagujících žlázek

Σ.....reagovaly všechny žlásky

().....počet reagujících žlázek

—.....reakce neproběhla

L.....lícová (svrchní) strana listu

R.....rubová (spodní) strana listu

6. DISKUSE

K histochemickému důkazu fenolu v pletivu listu bylo připraveno činidlo, které obsahuje 0,05% roztok 4-nitrosofenolu a kyselinu sírovou. Jedna kapka byla aplikována na listový povrch každého testovaného rostlinného druhu. K pozorování zbarvení vzniklého indofenolu byl použit stereomikroskop. Pozitivní test byl indikován objevením se příslušně zbarveného indofenolu, tzn. červeným, resp. zeleným vybarvením žlázek „*Lamiaceae*“.

Sledování výskytu monoterpenických fenolů probíhalo na listech sbíraných od konce dubna do poloviny října. Zachycovalo tedy značnou část vegetačního období jednotlivých rostlin a daná ontogenetická stádia mohla mít taktéž vliv na výskyt a akumulaci fenolů v siličných žlázkách. Jednotlivé odběry vzorků probíhaly v téměř pravidelných intervalech (zpravidla se opakovaly po 6- 8 dnech) do konce června. Pak následovala proluka a sběr pokračoval až v říjnu.

Celkem bylo provedeno jedenáct sběrů vzorků z každé rostliny a během každého sběru bylo zaznamenáno v jaké fázi vývoje se rostlina nachází zejména zda kvete nebo je již po odkvětu.

Většinou byly nasbírané vzorky zpracovány čerstvé, v zápětí po odebrání listů z rostlin. Jedná se o listy ze sběru č. 1, 2, 3, 4, 5, 10 a 11. Vzorky nasbírané ve zbývajících sběrech (tj. sběr č. 6, 7, 8 a 9) nemohly být zpracovány ihned, a proto byly uskladněny v mrazničce na katedře farmakognosie a zpracovány později. U každého vzorku je poznamenám datum sběru a datum jeho zpracování (tj. provedení histochemického důkazu).

Samotné provedení histochemického testu spočívalo v pozorování chemické reakce, která proběhla v sekrečních útvarech patrných na listovém povrchu daných rostlin. Po nanesení činidla na listový povrch docházelo ke třem různým reakcím:

- a) nedošlo k barevné změně (reakce vůbec neproběhla)
- b) došlo k barevné změně, žlásky se zbarvily červeně
- c) došlo k barevné změně, žlásky se zbarvily zeleně

K reakci docházelo ihned po nanesení činidla nebo bylo nutno zpravidla 1 až 2 minuty

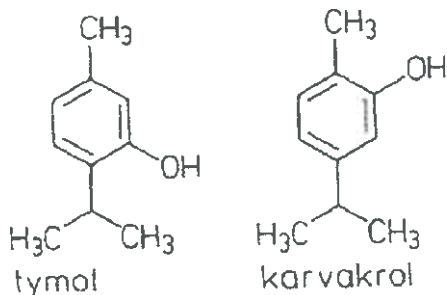
počkat, než reakce proběhla. Barevné změny byly zaznamenány a porovnány s předchozími výsledky, současně byl zaznamenán při pozitivním testu i počet žlázek, u kterých došlo k reakci, jejich rozmístění na ploše listu popř. nějaké pozorované anomálie. Histochemický test byl prováděn na spodní i svrchní straně listu (u některých druhů zde byly patrné rozdíly ve zbarvení žlázek). Reakce byla pozorována stereomikroskopem se zvětšením 6,3 x 4.

Rostlinný materiál zvolený pro tuto práci byl sbírán z 20 druhů rostlin čeledi *Lamiaceae*. Obsah fenolických látek ve zkoumaných druzích je různý.

Výsledky byly na závěr porovnány se známým složením fenolických látek u jednotlivých druhů i v rámci celé pozorované skupiny.

Histochemický test, který byl použit při tomto pozorování, byl popsán Feiglem (1966).(9) Je založen na specifické reakci mezi reakčním činidlem a funkční skupinou sledované látky. A slouží jako rychlá metoda k lokalizaci místa, kde jsou akumulovány monoterpenické fenoly. Nejvýznamnějšími monoterpenickými fenoly, které se vyskytují

v čeledi *Lamiaceae* jsou tymol a karvakrol, jejichž výskyt byl hlavním cílem pozorování.



Pokud některé žlásky nereagují na přidávané činidlo, nemusí to znamenat, že v silici nejsou přítomny fenolické látky.

Množství těchto látek může pouze klesnout pod

hranici, při které nejsou pomocí histochemického testu prokazatelné.

Thymus serpyllum L., *Thymus vulgaris* L., *Satureja montana* L., *Satureja hortensis* L., *Nepeta cataria* L. a *Origanum vulgare* L. jsou rostlinné druhy, ve kterých je prokázána přítomnost obou výše zmiňovaných fenolických látek. Zelené zbarvení žlázek u vzorků *O. vulgare* L. a *S. hortensis* L. odpovídá přítomnosti karvakrolu v silici těchto druhů. U *O. vulgare* L. se v silici nachází i tymol způsobující vznik červeně zbarvených reakčních produktů, ale jeho množství je velmi malé a tak je jeho reakce s 4-nitrosofenolem potlačena převažujícím karvakrolem. Během vývoje rostlin se mění pouze rozložení karvakrolu ve žlázkách na celé ploše listu. U *S. hortensis* L. probíhá reakce, při které se žlásky zbarví zeleně. Jedná se o očekávaný průběh, protože hlavní složkou silice je karvakrol (až 30%). Tymol se v tomto případě v silici nevyskytuje nebo jeho množství v silici je nepatrné,

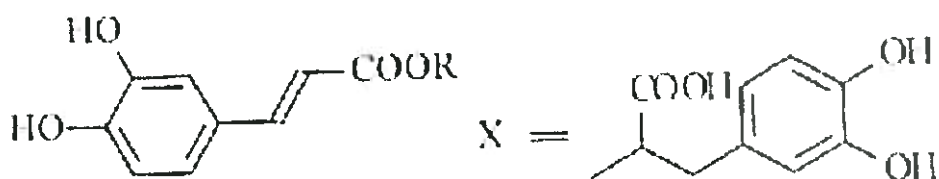
podobně jako u *O. vulgare* L.. V době květu *S. hortensis* L. patrně dochází ke snížení množství karvakrolu ve žlázkách, protože byl na svrchní straně pozorován úbytek počtu reagujících žlázek. Toto pozorované snížení reagujících žlázek nebylo příliš razantní.

U *T. serpyllum* L., *T. vulgaris* L. a *S. montana* L. byla zjištěna přítomnost karvakrolu i tymolu. U *S. montana* L. je hlavní složkou silice karvakrol, proto se většina žlázek po přidání činidla barví zeleně. Jen u několika žlázek bylo pozorováno červené zbarvení, tj. žlázek ve kterých převládá obsah tymolu (celkově je jeho podíl v silici zanedbatelný). Jednoznačně převládá obsah karvakrolu, což je v souladu se získanými poznatky o složení silice. I když by se dala očekávat stejná reakce žlázek u *T. vulgaris* L. a *T. serpyllum* L., je zde patrný rozdíl ve složení silice v době květu obou pozorovaných rostlin. Při pozorování mateřídoušky vznikají červeně i zeleně zbarvené reakční produkty, svědčící o přítomnosti monoterpenických fenolů v silici (karvakrol a tymol). Obsah těchto látek v silici je vysoký (až 50%), proto reagují pozitivně téměř všechny žlázy na celé ploše listu. V průběhu pozorování docházelo ke změnám zbarvení žlázek, což souvisí s rozdílným podílem sledovaných látek v silici, dokonce je zde rozdíl i mezi svrchní a spodní stranou listu. Tento rozdíl se sjednotil až po odkvětu rostliny, kdy patrně podíl tymolu v silici vysoce převažuje nad karvakrolem. Podobné jsou reakce žlázek u tymiánu v období před kvetením rostliny. Ale při květu pozorovaného druhu převládá v silici karvakrol. Převaha tymolu v silici se projeví až po odkvětu rostliny (podobně jako u mateřídoušky). Podle zjištěného složení silice by však mělo množství tymolu převládat nad karvakrolem, tento poměr se během vývoje rostliny mění (podle výsledků prováděných histochemických testů).

Zvláštní pozici v této skupině má *N. cataria* L.. Podle různých studií její silice obsahuje velké množství karvakrolu a stopy tymolu. Výsledky pozorování neodpovídají zjištěnému složení silice. Karvakrol nebyl detekován při žádném sběru a tymol pouze zpočátku a později zcela vymizela pozitivní reakce žlázek na přidávané činidlo. Vysvětlení této situace není jednoduché. Tento stav může být způsobena kolísavým složením silice během růstu rostliny, chemodiverzitou u tohoto druhu nebo výskytem jiných obsahových látek, které mohou překrýt nebo utlumit reakci sledovaných fenolických látek s přidávaným činidlem. Zřetelnější vysvětlení by možná poskytlo dlouhodobější pozorování a provádění histochemického důkazu nebo podrobnější zkoumání složení silice např. pomocí chromatografických metod.

U ostatních rostlin: *Betonica officinalis* L., *Glechoma hederacea* L., *Hyssopus officinalis* L., *Lavandula officinalis* L., *Leonurus cardiaca* L., *Marrubium vulgare* L.,

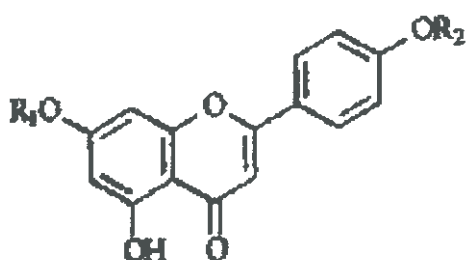
Melissa officinalis L., *Mentha crispa* ROTH., *Ocimum basilicum* L., *Salvia officinalis* L. a *Salvia pratensis* L. není přímo zjištěna přítomnost karvakrolu a tymolu v silici, ale po přidání činidla stále dochází k tvorbě barevných reakčních produktů. Indofenolové reakci, která dokazuje přítomnost karvakrolu a tymolu, podléhají i jiné sloučeniny. Podmínkou je, aby se jednalo o látky fenolického charakteru, tj. aby měly hydroxyskupinu na aromatickém jádře a současně byly substituovány v poloze *ortho*- nebo *meta*- na aromatickém kruhu.(9) Z uvedených údajů vyplývá, že indofenolové reakci s 4-nitrosofenolem v prostředí koncentrované kyseliny sírové mohou podléhat i jiné sloučeniny než karvakrol a tymol. Příkladem mohou být některé fenolické kyseliny, které se velmi často vyskytují u čeledi *Lamiaceae*. Například kyselina rozmarinová, kyselina 6-hydroxykávová nebo kyselina chlorogenová. Uvedené fenolické kyseliny se nacházejí napříč celou skupinou pozorovaných druhů.(10)



kyselina kávová R = H

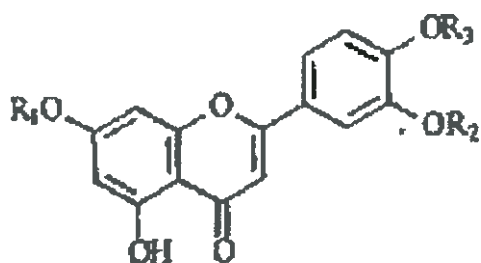
kyselina rozmarinová R = X

Dalšími sloučeninami, které mohou ovlivňovat reakci žlázek na přidávané činidlo jsou flavonoidy, konkrétně fenolické flavonoidy. Jedná se o deriváty fenylchromanu, které jsou nejčastěji arylované v poloze 2, tzv. flavany. Flavany jsou v přírodě hojně rozšířeny. Jednotlivé flavonoidy se navzájem liší počtem a polohou hydroxylových skupin na obou aromatických kruzích a napojením cukrů nebo organických kyselin. V rostlinném pletivu se flavonoidy účastní oxidačně-redukčních pochodů a jsou i složkami silic. Nejčastěji vyskytované flavonoidy v čeledi *Lamiaceae* patří do skupiny flavonů (např. apigenin, luteolin, diosmetin, genkwanin) a flavonolů (např. kvercetin, kaempferol).(2,13)



apigenin $R_1=R_2=H$

genkwanin $R_1=CH_3, R_2=H$



luteolin $R_1=R_2=R_3=H$

diosmetin $R_1=R_2=H, R_3=CH_3$

Fenolické sloučeniny, které jsou v ortho- nebo meta- poloze substituovány mohou poskytovat reakci vedoucí ke vzniku barevného produktu, v našem případě červeně nebo zeleně zbarvených žlázek. Hydroxylová skupina se vyskytuje i v řadě dalších sloučenin přítomných ve žlázkách sledovaných rostlin, např. borneol, nerol, geraniol, linalool. Ve struktuře těchto látek se ale nevyskytuje aromatické jádro, a proto nemohou poskytovat sledovanou indofenolovou reakci.

Podle získaných výsledků z histochemických důkazů a poznatků čerpaných z literatury nebyla nalezena souvislost mezi jednotlivými fenolickými sloučeninami (fenolickými kyselinami a flavonoidy) a zbarvením žlázek při provedení reakce. Lze však tvrdit, že rostliny obsahují substituované fenolické látky, přičemž jejich množství v průběhu růstu rostlin kolísá.

Pro přesnější vyhodnocení výsledků a nalezení souvislosti mezi reakcemi žlázek na přidávané činidlo a obsahovými látkami by bylo nutné použít speciálnější metody, např. chromatografické metody (TLC, plynová chromatografie).

Podle získaných výsledků z prováděných histochemických testů s 4-nitrosfenolem mohou být sledované rostliny rozděleny do čtyř základních skupin, a ty mohou být dále rozčleněny do dalších podskupin:

- rostliny nereagující na přidávané činidlo
- rostliny reagující v převážné většině zeleným zbarvením žlázek
- rostliny reagující v převážné většině červeným zbarvením žlázek
- rostliny reagující červeným i zeleným zbarvením žlázek

1) Rostliny nereagující na přidávané činidlo

Do této skupiny jsou zahrnuty tři rostlinné druhy – *Lamium album* L., *Mentha piperita* L. a *Prunella vulgaris* L.. Uvedené rostliny nereagovaly ani v jednom histochemickém testu na přidávané činidlo. Příčiny mohou být jednotlivých rostlin rozdílné. I když *M. piperita* L. obsahuje značné množství silice, nedochází k reakci s 4-nitrosfenolem, jelikož hlavními složkami jsou volný nebo esterově vázaný mentol (cyklický alkohol) a menton (cyklický aldehyd) a tyto látky neposkytují sledovanou reakci.

Ani další významnější složky silice nejsou fenoly, které podléhají indofenolové reakci s činidlem.

Podobná je situace u *L. album* L. a *P. vulgaris* L.. Obě rostliny obsahují fenolické látky, které by prováděným histochemickým testem mohly být dokázány. U *P. vulgaris* L. jsou přítomny fenolické kyseliny (kyselina rozmarinová, 6-hydroxykávová nebo 6-hydroxyrozmarinová) a flavonoidy. Podobně se u *L. album* L. vyskytují fenolické látky (kyselina chlorogenová a flavonoidy - kvercetin, kaempferol). Množství silice v uvedených rostlinách je ovšem jen stopové a prováděným histochemickým testem se jejich obsah ve žlázkách neprojeví.

2) Rostlinné žláзки reagují většinou zeleným zbarvením

Do této skupiny je zahrnuto pět druhů rostlin – *Hyssopus officinalis* L., *Origanum vulgare* L., *Satureja hortensis* L., *Satureja montana* L. a *Thymus vulgaris* L.. U těchto sledovaných rostlin v průběhu pozorování docházelo k zelenému zbarvení žlázek po přidání činidla. Do této skupiny jsou zařazeny i některé rostliny u nichž proběhla reakce vedoucí k červeným reakčním produktům. Počet červeně reagujících žlázek byl však k počtu zeleně reagujících žlázek nepatrný: *H. officinalis* L., *S. montana* L. a *T. vulgaris* L..

Během pozorování se měnilo množství reagujících žlázek u všech rostlin zařazených do této skupiny, a proto je podle pozorování a změn počtu zeleně zbarvených žlázek lze ještě rozdělit na tři podskupiny:

a) Počet reagujících žlázek se snížil: *Satureja hortensis* L. a *Origanum vulgare* L.

U obou rostlin bylo pozorováno snížení počtu reagujících žlázek v období jejich květu.

b) Počet reagujících žlázek se zvýšil: *Thymus vulgaris* L.

U *T. vulgaris* L. se počet zeleně zbarvených žlázek zvyšuje velmi záhy, což může být spojeno s začátkem kvetení sledovaného druhu. Již začátkem kvetení rostliny je patrná razantní změna ve zbarvení žlázek (reagují pouze zeleným zbarvením). Tento názor může být podpořen faktem, že po odkvětu rostlin reagují žláзки na přidávané činidlo opět červeným zbarvením.

c) Počet reagujících žlázek se nemění: *Hyssopus officinalis* L. a *Satureja montana* L.

U *S. montana* L. se zbarvují po celou dobu všechny žláзки, bez ohledu na období květu rostliny. Pouze u posledního sběru, tj. po odkvětu je zaznamenána reakce s výsledným červeným zbarvením žlázek. Nelze ovšem s jistotou tvrdit, že tento jev souvisí s vývojem

rostliny, protože daná reakce byla pozorována pouze na omezeném počtu reagujících žlázek. U *H. officinalis* L. nelze s jistotou říci, co je hlavní příčinou změny reakce na žlázkách. Celkově je počet reagujících žlázek velmi malý nebo žádný. Nebyly pozorovány změny během růstu rostliny ani na začátku a průběhu kvetení pozorovaného druhu. Ovšem po odkvětu je zaznamenáno červené zbarvení žlázek po přidání činidla, což může mít souvislost s odkvětem rostliny. Podobný jev je pozorován u *T. vulgaris* L. a *S. montana* L..

3) Rostlinné žlázy reagují většinou červeným zbarvením

Do této skupiny je zahrnuto sedm druhů rostlin – *Betonica officinalis* L., *Glechoma hederacea* L., *Lavandula officinalis* L., *Leonurus cardiaca* L., *Melissa officinalis* L., *Nepeta cataria* L. a *Salvia pratensis* L.. Podobně jako u předešlé skupiny lze rostliny rozdělit do tří podskupin:

- a) Počet reagujících žlázek se snižuje: *Nepeta cataria* L., *Melissa officinalis* L. a *Betonica officinalis* L.

U *N. cataria* L. se setkáváme s vymizením reakce, tato změna nesouvisí s obdobím kvetení rostliny, protože vymizení reakce je patrné dlouho před květem rostliny a ani v době květu nenastává změna.

Naopak u *B. officinalis* L. a *M. officinalis* L. nastává snížení počtu reagujících žlázek před obdobím kvetení nebo v jeho počátku, toto snížení počtu reagujících žlázek může vést až k vymizení pozitivní reakce.

- b) Počet reagujících žlázek se zvyšuje: *Lavandula officinalis* L. a *Leonurus cardiaca* L.

Vyšší počet reagujících žlázek u *L. officinalis* L. může být dána vyšším obsahem fenolických látek ve žlázkách v období květu sledované rostliny. U *L. cardiaca* L. ovšem zvýšení počtu červeně reagujících patrně nekoreluje s obdobím kvetení rostliny.

- c) Počet reagujících žlázek se nemění: *Glechoma hederacea* L. a *Salvia pratensis* L.

U žádné z rostlin nelze tvrdit, že změna reakce žlázek na přidání činidla je závislá na jejich vegetačním růstu. Během doby kvetení rostlin nedochází ke zřetelné změně reakce na žlázkách. Ani vymizení reakce na svrchní straně listu u rostliny *S. pratensis* nesouvisí s růstem sledované rostliny.

4) Rostliny reagující červeným i zeleným zbarvením žlázek

Do této skupiny je zahrnuto pět druhů rostlin – *Marrubium vulgare* L., *Mentha crispa* ROTH., *Ocimum basilicum* L., *Salvia officinalis* L. a *Thymus serpyllum* L.. U této skupiny je možné zařazení do níže uvedených podskupin.

- a) Počet zeleně zbarvených žlázek se zvyšuje a počet červeně zbarvených žlázek klesá:
Marrubium vulgare L., *Mentha crispa* ROTH.

Zvyšující se počet zeleně reagujících žlázek u *M. crispa* ROTH. souvisí se změnami ve složení silice v období květu pozorované rostliny. Tato souvislost nebyla pozorována u *M. vulgare* L..

- b) Nejdříve reagovaly žlázy červeným zbarvením, následně je reakce negativní, následuje reakce se vznikem jen zeleně zbarvených reakčních produktů: *Ocimum basilicum* L. a *Salvia officinalis* L.

U obou rostlin bylo pozorováno, že počet sběrů kdy reagovaly žlázy zeleným a červeným zbarvením je shodný (*O. basilicum* L. – čtyři sběry, *S. officinalis* L. – tři sběry). K vymizení reakce dochází na počátku doby kvetení, avšak nástup pozitivní reakce nekoreluje s dobou odkvětu rostlin, ale nastává již v průběhu květu pozorovaných rostlin.

- c) Rozdíly v reakci žlázek na líci a na rubu: *Thymus serpyllum* L.

T. serpyllum L. je zvláštní případ, po celou dobu kvetení je rozdíl v reakcích na obou stranách listu. Na rubu je po celé sledované období zbarvení žlázek červené, na líci listu jen na začátku růstu, v průběhu vegetace reagují všechny žlázy zeleně. Po odkvetení rostliny dochází, jen k červenému zbarvení žlázek při reakci s činidlem. Obsah fenolických látek v silici a tím i zbarvení žlázek na ploše listu souvisí s obdobím kvetení a růstu rostliny.

Z uvedených výsledků je patrné, že existuje závislost mezi obsahem a množstvím fenolických látek v silici a mezi vývojem rostlin, zejména se změnami souvisejícími s kvetením rostlin nebo obdobím po odkvětu sledovaných rostlin. U jedenácti druhů rostlin je tato souvislost přímo patrná z výsledků prováděných důkazů, jsou to *Betonica officinalis* L., *Lavandula officinalis* L., *Melissa officinalis* L., *Mentha crispa* ROTH., *Ocimum basilicum* L., *Satureja hortensis* L., *Salvia officinalis* L., *Salvia pratensis* L., *Thymus serpyllum* L. a *Thymus vulgaris* L.. U zbývajících druhů nelze tuto závislost dokázat, ale

předpokládá se. Nevýhodou je, že pozorování a testování rostlin neprobíhalo přes hlavní období květu rostlin, tj. červenec, srpen a září. V žádném případě nelze vyloučit, že by v tomto dlouhém období nedošlo ke změnám v reakcích na žlázkách (tab.1).

Kromě vývoje rostlin by mohlo mít vliv na obsah silice i uchování vzorků před jejich zpracováním. U vzorků, které byly uchovávány v chladu však nebyly pozorovány žádné významné změny v reakcích žlázek oproti vzorkům zpracovaných ihned. Silice stárnutím a uchováváním mění své vlastnosti a chemické složení, ale tyto změny jsou zpravidla podporovány vlhkostí, teplem, světlem a vzdušným kyslíkem, tudíž odlišným prostředím, než ve kterém byly uchovávány.

7. ZÁVĚR

Byla provedena série histochemických testů na vzorcích listů rostlinných druhů čeledi *Lamiaceae*. Reakcí s 4-nitrosufenolem byly dokazovány fenolické látky v siličných žlázkách.

Na základě výsledků testů lze sledované rostliny rozdělit do čtyř skupin:

1) Rostliny se siličnými žlázkami, které nereagují na přidávané činidlo

Do této skupiny jsou zahrnuty tři rostlinné druhy – *Lamium album* L., *Mentha piperita* L. a *Prunella vulgaris* L..

2) Rostliny se siličnými žlázkami, které reagují většinou zeleným zbarvením

Do této skupiny je zahrnuto pět druhů rostlin – *Hyssopus officinalis* L., *Origanum vulgare* L., *Satureja hortensis* L., *Satureja montana* L. a *Thymus vulgaris* L..

3) Rostliny se žlázkami, které reagují většinou červeným zbarvením

Do této skupiny je zahrnuto sedm druhů rostlin – *Betonica officinalis* L., *Glechoma hederacea* L., *Lavandula officinalis* L., *Leonurus cardiaca* L., *Melissa officinalis* L., *Nepeta cataria* L. a *Salvia pratensis* L..

4) Rostliny se žlázkami, které reagují červeným i zeleným zbarvením žlázek

Do této skupiny je zahrnuto pět druhů rostlin – *Marrubium vulgare* L., *Mentha crispa* ROTH., *Ocimum basilicum* L., *Salvia officinalis* L. a *Thymus serpyllum* L..

U některých rostlin byla prokázána závislost složení a množství fenolických látek ve žlázkách na vývoji rostlin. Jsou to: *Betonica officinalis* L., *Lavandula officinalis* L., *Melissa officinalis* L., *Mentha crispa* ROTH., *Ocimum basilicum* L., *Satureja hortensis* L., *Salvia officinalis* L., *Salvia pratensis* L., *Thymus serpyllum* L. a *Thymus vulgaris* L.. U zbývajících druhů nelze tuto závislost z výsledků prováděného testu dokázat.

Tento histochemický test slouží k orientačnímu a rychlému zjištění výskytu monoterpenických fenolů.

Bylo zjištěno, že indofenolové reakci podléhají i jiné sloučeniny než karvakrol a tymol. Takovými látkami jsou i fenolické kyseliny a flavonoidy, ale musí ve své struktuře obsahovat substituované fenolické jádro.

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. Tomko, J. a kol.: Farmakognózia, 2.vydání, Martin,Osveta 1999.
2. Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J.: Obecná farmakognosie II., Sekundární látky, 3.vydání, Praha, SPN 1989.
3. Podlech, D.: Léčivé rostliny, 2.vydání, Praha, Slovart 2002.
4. Můnker, B.: Plané rostliny střední Evropy, 1.vydání, Praha, Ikar1998.
5. Bruneton, J.: Pharmacognosy, phytochemistry medicinal plants, Paris, Lavoisier Publishing 1999.
6. Glasby, J. S.: Dictionary of plants containing secondary metabolites, London, Taylor and Francis Ltd.1991.
7. Hänsel, R., Sticher, O.: Pharmakognosie, phytopharmazie, 7.vydání, Berlin, Springer-Verlag 2004.
8. Lewis, W.H.: Medical botany (plants affecting human health), New Jersey, Wiley 2003.
9. Gersbach, P.V., Wyllie, S.G., Sarafis, V.: A new histochemical method for localization of the site of monoterpene in plant secretory structures. *Ann. Bot.*, 2001; 88, 521-525.
10. Pedersen, J.A.: Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family *Lamiaceae* determined by ESR spectroscopy. *Biochem. Syst. Ecol*, 2000; 28, 229-253.
11. Corsi, G., Bottega,S.: Glandular hairs of *Salvia officinalis*: New data on morphology, localization and histochemistry in relation to function. *Ann. Bot.*, 1999; 84, 657-664.
12. Serrato-Valenti, G., Bisio, A., Cornara, L., Ciaralloi, G.: Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oils. *Ann. Bot.*, 1997; 79, 329-336.
13. Yinrong, L., Yeap, F.: Polyphenolics of *Salvia* – a rewiev. *Phytochem.*, 2002; 59, 117-140.
14. Upson, T.M., Grayer, R.J., Greenham, J.R.: Leaf flavonoids as systematic characters in the genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochem. Syst. Ecol*, 2000; 28, 991-1007.
15. Marin, P.D., Grayer, R.J., Kite, G.C., Matevski, V.: External leaf flavonoids of *Thymus* species from Macedonia. *Biochem. Syst. Ecol*, 2003; 31, 1291-1307.
16. Valant-Vetschera, K.M., Roitman, J.N., Wollenweber, E.: Chemodiversity of exudate flavonoids in some of the *Lamiaceae*. *Biochem. Syst. Ecol*, 2003; 31, 1279-1289.
17. Jamzad, Z., Grayer, J., Kite, G.C.: Leaf surface flavonoids in Iranian species of *Nepeta*

- and some related genera. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2003; 31, 587-600.
18. Grayer, R., Viviera, R.F., Price, A.M., Kite, G.C.: Characterization of cultivars within species of *Ocimum* by exudate flavonoid profiles. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2004; 32, 901-913.
 19. Bisio A., Corallo A., Gastaldo P., Romussi G.: Glandular hairs and secreted material in *Salvia blepharophylla*. *Ann. Bot.*, 1999; 83, 441-452.
 20. Český lékopis 2005, 1. vydání, Praha, Grada Publishing 2005.
 21. Dušková, J.: Vybrané kapitoly z anatomie rostlin pro farmaceuty, Praha, Karolinum 1995.
 22. Kresánek, J., Krejča, J.: Atlas léčivých rostlin a lesních plodů, Martin, Osveta 1982.