

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**



KATEDRA FARMAKOGNOZIE

**ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH
FENOLICKÝCH LÁTEK**

Disertační práce

Mgr. Vendula Vrchovská

Školitel: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Hradec Králové 2006

Farmaceutická fakulta UK
Hradec Králové
knihovna
Pr.č. Fa 43691

Děkuji Doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. za odborné vedení, pomoc a cenné rady v průběhu mého doktorského studia. Mé poděkování patří rovněž Doc. RNDr. Jaroslavu Duškovi, CSc., vedoucímu katedry farmakognozie Farmaceutické fakulty UK, za vytvoření dobrých pracovních podmínek.

Dále děkuji také Prof. Dr. Paule Andrade a Dr. Patricii Valentão za odborné vedení a podporu během stáže na jejich pracovišti FaF UP a Fondu Mobility UK a programu SOCRATES/ERASMUS za umožnění tohoto zahraničního studijního pobytu.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. ŘEŠENÁ PROBLEMATIKA	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1. VOLNÉ RADIKÁLY, REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A DUSÍKU	10
3.2. REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A METODY JEJICH STANOVENÍ	10
3.2.1. SUPEROXID	10
3.2.2. PEROXID VODÍKU	15
3.2.3. HYDROXYLOVÝ RADIKÁL	16
3.2.4. KYSELINA CHLORNÁ	21
3.3. REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU A METODY JEJICH STANOVENÍ	23
3.3.1. OXID DUSNATÝ	23
3.3.2. PEROXYNITRIT	27
3.4. SYNTETICKÉ RADIKÁLY A METODY JEJICH STANOVENÍ	30
3.4.1. DPPH	30
3.4.2. GALVINOXYL	30
3.4.3. FREMYHO SŮL	31
3.4.4. ABTS	31
3.5. LIPIDOVÁ PEROXIDACE A METODY JEJÍHO STANOVENÍ	32
3.6. METODY HODNOTÍCÍ REDOXNÍ VLASTNOSTI LÁTEK	33
3.6.1. METODA FRAP	33
3.6.2. CYKLICKÁ VOLTAMETRIE	34
3.6.3. HPLC METODY S ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ	34
3.7. FENOLICKÉ LÁTKY - FLAVONOIDY A FENOLICKÉ KYSELINY	35
3.7.1. BIOSYNTÉZA FLAVONOIDŮ	37
3.7.2. ANTIOXIDAČNÍ VLASTNOSTI FENOLICKÝCH LÁTEK	39
4. MATERIÁL A METODY	45
4.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	45
4.2. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	46
4.3. ROSTLINNÝ MATERIÁL	47
4.3.1. <i>Ballota nigra</i> (Lamiaceae)	47
4.3.2. <i>Linaria vulgaris</i> L. (Scrophulariaceae)	47
4.3.3. <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>costata</i> DC. (Brassicaceae) („trouchuda“ zelí)	47
4.4. PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO HPLC ANALÝZU A HODNOCENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	48
4.4.1. <i>Ballota nigra</i>	48
4.4.2. <i>Linaria vulgaris</i>	48
4.4.3. <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>costata</i> DC.	48

4.5. HPLC ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK	49
4.5.1. HPLC ANALÝZA	49
4.6. HPLC ANALÝZA ORGANICKÝCH KYSELIN	52
4.6.1. PŘÍPRAVA VZORKŮ	52
4.6.2. HPLC ANALÝZA	53
4.7. ZHÁŠENÍ DPPH	54
4.8. ZHÁŠENÍ SUPEROXIDOVÉHO RADIKÁLU	55
4.8.1. SUPEROXID GENEROVANÝ NEENZYMATICKY	55
4.8.2. SUPEROXID GENEROVANÝ ENZYMATICKY	56
4.9. ZHÁŠENÍ HYDROXYLOVÉHO RADIKÁLU	58
4.10. AKTIVITA VŮČI KYSELINĚ CHLORNÉ	60
4.11. ZHÁŠENÍ OXIDU DUSNATÉHO	62
4.12. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	63
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	65
5.1. BALLOTA NIGRA	65
5.1.1. HPLC ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK	65
5.1.2. HPLC ANALÝZA ORGANICKÝCH KYSELIN	67
5.1.3. ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA	69
5.2. LINARIA VULGARIS	74
5.2.1. HPLC ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK	74
5.2.2. HPLC ANALÝZA ORGANICKÝCH KYSELIN	76
5.2.3. ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA	78
5.3. BRASSICA OLERACEA var. COSTATA – zevní listy	83
5.3.1. HPLC ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK	83
5.3.2. HPLC ANALÝZA ORGANICKÝCH KYSELIN	86
5.3.3. ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA	87
5.4. BRASSICA OLERACEA var. COSTATA - vnitřní listy	94
5.4.1. HPLC ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK	94
5.4.2. HPLC ANALÝZA ORGANICKÝCH KYSELIN	99
5.4.3. ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA	101
6. ZÁVĚR	107
7. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY	110
8. LITERATURA	112
9. PŘÍLOHA	121

1. ÚVOD

V posledních letech se zvyšuje množství poznatků a úroveň znalostí o úloze volných radikálů při oxidačním stresu u živých organismů. Volné radikály mají vedle svých fyziologických funkcí (např. účast v procesu fagocytózy) také negativní působení na organismus při řadě onemocnění. Jde především o reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species - ROS) a dusíkové radikály (reactive nitrogen species - RNS), které působí na biologicky významné molekuly, především bílkoviny, lipidy a nukleové kyseliny a pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci. V těle působí antioxidantní systémy, které udržují tvorbu volných radikálů na fyziologické úrovni a eliminují tak poškození biomolekul; nemohou však plně organismus před účinky volných radikálů ochránit. Jednou z možností, jak zvýšit kvalitu antioxidantních systémů je působení antioxidantů. Antioxidanty jsou molekuly, které – jsou-li přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit - mohou zabráňovat nebo omezovat oxidační destrukci těchto látek. Kromě endogenních antioxidantů (kyselina močová, koenzym Q či glutathion) se do centra pozornosti dostávají zejména přírodní antioxidanty, přijímané s potravou. Jedná se o antioxidantní vitamíny (vitamín C, tokoferoly, karotenoidy) a také polyfenolické sloučeniny, k nimž řadíme zejména flavonoidy, fenolické kyseliny a katechiny. Ty jsou přítomny zejména v ovoci, víně, čaji a zelenině, důležitý zdroj představují také léčivé rostliny. Klinické a epidemiologické studie poukazují na korelaci mezi příjmem polyfenolických látek a prevencí některých onemocnění, např. kardiovaskulárních chorob, rakoviny, některých degenerativních onemocnění či procesu stárnutí. Z těchto důvodů stoupá zájem stanovit antioxidantní aktivitu látek rostlinného původu. Protože však většinu antioxidantů přijímáme v potravě ve směsi s ostatními látkami, které mohou působit jak synergisticky tak inhibičně, je snaha charakterizovat antioxidantní aktivitu směsných vzorků - rostlinných extraktů a potravin. Zjištění jejich účinku oproti jednotlivým radikálům nám může pomoci lépe pochopit mechanismus jejich antioxidantní aktivity a porovnat antioxidantní účinky různých směsí.

Je nutno, pro úplnost dodat, že zjištěná aktivita *in vitro* nemusí nutně odpovídat aktivitě *in vivo*. Přírodní látky přijímané v potravě podléhají v trávicím traktu metabolickým změnám a míra jejich účinku je podstatně ovlivněna resorpcí a dalším metabolismem. Informací o biologické dostupnosti a farmakokinetice těchto látek je dosud velmi málo a jsou nutně předmětem dalšího studia.

2. ŘEŠENÁ PROBLEMATIKA

Tato disertační práce, která má název „Antioxidační vlastnosti nízkomolekulárních fenolických látek“ se zabývá problematikou antioxidační aktivity extraktů z rostlin s obsahem fenolických látek a metodami jejího stanovení.

Cílem této práce bylo:

- Z dostupných informačních zdrojů vypracovat přehled metod stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro* se zaměřením na fenolické látky - flavonoidy a fenolické kyseliny.
- U vybraných vzorků (*Ballota nigra*, *Linaria vulgaris*, *Brassica oleracea* var. *costata* D.C.) identifikovat a kvantifikovat fenolické látky a organické kyseliny.
- Zjistit antioxidační aktivitu výše zmíněných vzorků oproti vybraným radikálům (DPPH, superoxidovému radikálu, hydroxylovému radikálu), kyselině chlorné a oxidu dusnatém.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. VOLNÉ RADIKÁLY, REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A DUSÍKU

V posledních letech bylo získáno mnoho dokladů o tom, že v organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species - ROS) a reaktivních forem dusíku (reactive nitrogen species - RNS) a že tyto látky mají značný fyziologický i patologický význam. Staly se proto předmětem intenzivního výzkumu a vědomosti o nich se postupně uplatňují v lékařské praxi. Jde o látky, které pohotově reagují s různými molekulami – mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami, proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy (nukleovými kyselinami) a i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však působí jako toxické látky a jako desinformační agens, schopní organismus poškodit a dokonce i usmrtit (1). Tab. 1 uvádí přehled a účinky hlavních druhů radikálů (2).

3.2. REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A METODY JEJICH STANOVENÍ

3.2.1. SUPEROXID

Superoxid má oxidační i redukční vlastnosti. Podléhá tzv. dizmutaci, při které jedna jeho molekula poskytuje elektron druhé, takže superoxid se vlastně zároveň oxiduje i redukuje a produkty reakce jsou kyslík a peroxid vodíku (Tab. 2). V biologických systémech je tato reakce urychlována specifickým enzymem - superoxid-dizmutázou (1). Superoxid je vlastně primárním ROS, který po reakci s jinými molekulami může poskytovat sekundární ROS, a to buď přímo a nebo za katalýzy enzymy nebo kovy. Tab. 2 shrnuje reakce superoxidového radikálu vedoucí k jeho přeměně na ROS.

Tab. 1: Povaha a biologické vlastnosti hlavních druhů radikálů

<i>Kyslíkové radikály</i>	
Kyslík	Excitovaný stav molekuly kyslíku UV nebo jiným zářením; reaguje s velkým počtem biologických molekul, také s lipidy membrán, čímž zahajuje peroxidaci
Superoxidový radikál	Slabý oxidant i reduktant s malou biologickou aktivitou; uvolňuje Fe(II) z některých železnatých komplexů a železo-síra proteinů, Fentonovou reakcí poskytuje hydroxylový radikál; má nízkou membránovou propustnost
Peroxid vodíku	Oxidační činidlo, reaguje pomalu s redukčními činidly jako jsou thioley; reaguje s redukovanými železnatými a měďnými solemi za tvorby hydroxylových radikálů; reaguje s hem-proteiny a peroxidázami a iniciuje tak radikálové reakce a lipidovou peroxidaci; je membránově propustný
Hydroxylový radikál	Extrémně reaktivní s téměř všemi biologickými molekulami; způsobuje modifikaci DNA (poškození bází a zlomy řetězce), poškození proteinů a enzymů, lipidová peroxidace; téměř bez biologických účinků
<i>Dusíkové radikály a radikály chloru</i>	
Kyselina chlorná	Silný oxidant celé řady biologických látek, jako thiolů a thioéterů, aminů, fenolů a nenasycených vazeb; selektivnější než hydroxylový radikál, oxiduje centra se železem a způsobuje řetězení proteinů; je membránově propustná
Chloraminy	Slabší a déle „žijící“ oxidant než kyselina chlorná, reaguje s thioley, thioétery, centry se železem; různá toxicita chloraminů v závislosti na polaritě a membránové propustnosti; chloraminy α -AMK se pomalu rozkládají na potenciálně toxické aldehydy.
Oxid dusnatý	Reaguje pohotově se superoxidem za vzniku peroxynitritu; tvoří komplexy s hem-proteiny; inaktivuje centra se železem, sírou; tvoří nitrosothioly.
Peroxynitrit	Nestabilní krátkodobý silný oxidant s vlastnostmi podobnými thiolům; rozkládá se na dusičnan; změna reaktivity po reakci s uhličitánem.

Tab. 2: Reakce vedoucí k tvorbě či konverzi ROS

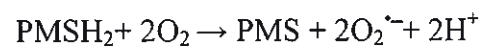
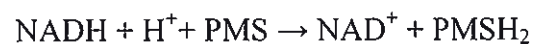
(1)	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
(2)	$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{\cdot} + O_2$
(3)	$O_2^{\cdot-} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$
(4)	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + OH^{\cdot} + Fe^{3+}$

3.2.1.1. Metody stanovení superoxidového radikálu

K produkci hydroxylového radikálu se nejčastěji využívá:

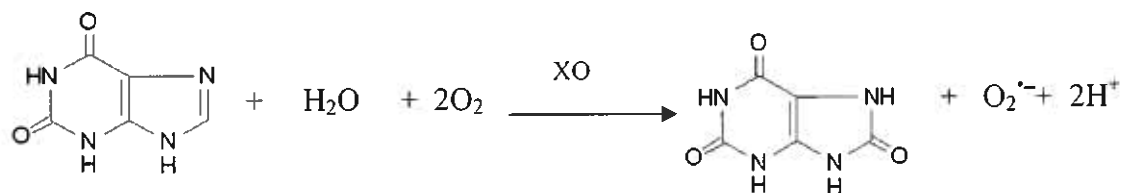
Neenzymová metoda

K produkci radikálu je využívána reakce 5-metylfenazinium-metyl-sulfátu (PMS) a nikotinamidudinukleotidu (NADH). Po redukci PMS způsobené NADH, redukovaný PMS reaguje s kyslíkem a dochází k tvorbě $O_2^{\cdot-}$ (3):



Enzymová metoda

Radikál $O_2^{\cdot-}$ se tvoří při reakci xantinoxidázy (XO) s xantinem (nebo hypoxantinem). Xantinoxidáza katalyzuje jeho přeměnu na kyselinu močovou, přičemž se tvoří $O_2^{\cdot-}$:



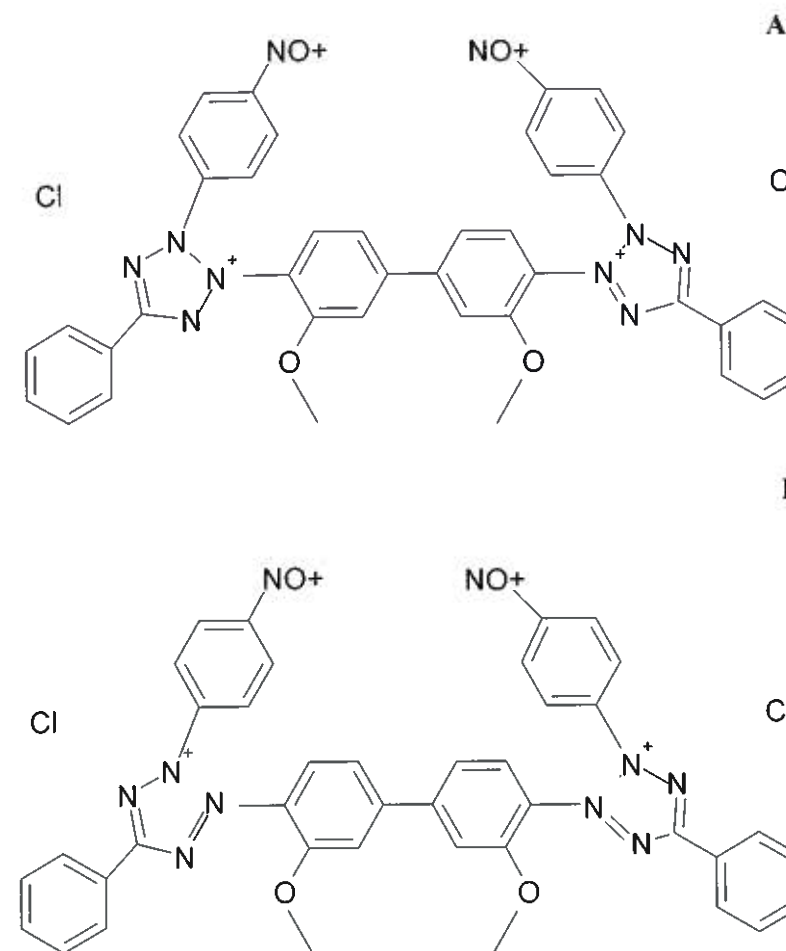
Radiolýza vody

Superoxid lze produkovat také radiolýzou vody (3).

Detekce radikálu:

1. Reakce superoxidového anion-radikálu s nitrotetrazolinovou modří

Superoxidový radikál redukuje nitrotetrazolinovou modř na formazan (Obr. 1), modrou sloučeninu, která vykazuje maximum absorpce při vlnové délce 560 nm. Detekce se provádí spektrofotometricky při 550-560 nm. Pro detekci v oblasti UV může být nitrotetrazolinová modř nahrazena syntetickým formazanovým barvivem WST-1, které je vzhledem k dobré rozpustnosti vhodnější pro provádění testu na mikrotitračních destičkách (4).

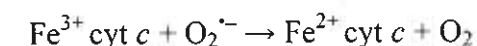


Obr. 1: Struktura (A) nitrotetrazolinové modři a (B) formazanu

Tato metoda je široce využívána ke stanovení antioxidační aktivity rostlinných extraktů s obsahem flavonoidů (5-9), hydroxyskořicových kyselin (10,11), fenolických kyselin (12) či ke stanovení antioxidační aktivity izolovaných hydroxyskořicových kyselin (13) a flavonoidů (14).

2. Reakce superoxidového anion-radikálu s cytochromem c

V této reakci ferricytochrom *c* (Fe^{3+} cyt *c*) oxiduje superoxidový radikál a sám se redukuje na ferocytochrom *c* (Fe^{2+} cyt *c*):



Detekce probíhá spektrofotometricky při 550 nm (15).

Tato zkouška byla využita např. pro stanovení antioxidační aktivity extraktů z kořenů *Microdermis keyana* (Pandaceae) (16).

3. Reakce superoxidového anion-radikálu s 2,2-dimetyl-2H-pyrol-1-oxidem (DMPO) či 5-terc-butoxykarbonyl 5-metyl-1-pyrolin N-oxidem (BMPO)

Reakcí superoxidu s DMPO či BMPO vznikne adukt, který je možné stanovit pomocí metody ESR (elektronová spinová rezonance) (17) nebo HPLC ve spojení s elektrochemickou detekcí (HPLC-ECD) (18).

Touto metodou např. Leopard et al. stanovovali zhasací schopnost extraktu ze směsi 4 rostlin: *Arctium lappa* (Asteraceae), *Rumex acetosella* (Polygonaceae), *Ulmus rubra* (Ulmaceae) a *Rheum officinale* (Polygonaceae) (19).

4. Reakce superoxidového anion-radikálu s luminolem.

Detekce se provádí měřením chemiluminiscence. Vzhledem k tomu, že luminol je schopen reagovat s různými kyslíkovými radikály (tedy nejen s $O_2^{\cdot-}$), postihuje tato metoda široké spektrum antioxidační aktivity látek (15,20).

Nejčastěji používanou chemiluminiscenční látkou pro detekci superoxidu je lucigenin. Jedná se o aromatickou sloučeninu, jejíž chemický název je bis-N-metylakridinium nitrát. Vykazuje zelenomodrou fluorescenci (21). Zkoušený byl také coelenterazin, lipofilní luminifer izolovaný z láchkovce *Aequorea* (22).

5. Reakce superoxidového anion-radikálu s adrenalinem

Superoxidový radikál oxiduje adrenalin za alkalického pH na červený adrenochrom, který se stanovuje spektrofotometricky při 480 nm (23).

6. Reakce superoxidového anion-radikálu s akonitázou

Superoxid inaktivuje akonitázu oxidací, při které dochází ke ztrátě železa z kubanového seskupení akonitázy. Aktivita akonitázy je sledována spektrofotometricky měřením konverze izocitrátu na cis-akonitát při vlnové délce 240 nm (15). Měření aktivity akonitázy bylo využito pro zjištění tvorby superoxidu v různých buňkách a tkáních - játrech, srdci, plicích a mozku (24,25).

7. Reakce superoxidového anion-radikálu s hydroethidinem

Hydroethidin (dihydroethidium) je membránově propustná látka jejíž dvouelektronovou oxidací vzniká červeně fluoreskující ethidium bromid. Po jeho vazbě na DNA dochází k nárůstu fluorescence (excitace, 500-530 nm; emise, 590-620 nm) Reakce je relativně specifická pro $O_2^{\cdot-}$, oxidovat hydroethidin může, jen velmi omezeně, také kyselina chlorná nebo peroxid vodíku. Využívá se zejména k detekci superoxidu v buňkách a tkáních (26,27). Tato metoda byla využita např. ke studiu antioxidačních vlastností extraktu z plodů amerického ženšenu (*Panax quinquefolius* L., Araliaceae) (28) či extraktu ze semen vína (29).

3.2.2. PEROXID VODÍKU

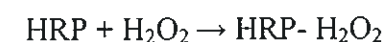
Ačkoliv peroxid vodíku není volným radikálem, do skupiny ROS určitě patří, neboť se účastní vzniku radikálů. Samotný peroxid vodíku je poměrně málo reaktivní, avšak v přítomnosti tranzitních kovů (dvojmocné železo Fe^{2+} nebo jednomocná měď Cu^+) se pohotově redukuje a vzniká tak vysoce toxický hydroxylový radikál OH^{\cdot} , který je extrémně silným oxidačním činidlem, v živé hmotě okamžitě reagujícím s okolními biomolekulami (viz hydroxylový radikál níže). Tato reakce se nazývá Haberova-Weissova reakce, známá je spíše jako Fentonova (Tab. 2-(4)). Na rozdíl od superoxidového radikálu je H_2O_2 schopen procházet biologickými membránami (3).

3.2.2.1. Metody stanovení peroxidu vodíku

1. Metody využívající peroxidázu z křene (horseradish peroxidase - HRP)

Většina metod pro detekci H_2O_2 je založená na oxidaci látky peroxidem vodíku a její následné stanovení.

K oxidaci látek (donorů vodíku) dochází peroxidem vodíku za katalýzy HRP.



Množství H_2O_2 může být monitorováno měřením fluorescence pomocí různých látek, jejichž oxidací dochází ke vzniku či zeslabení fluorescence např. skopoletinu (7-hydroxy-6-metoxykumarinu), diacetyldichlorofluorescinu, p-hydroxyfenylacetátu, homovanilové kyseliny či N-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazinu („Amplex Red“) (15).

Peroxid vodíku lze také měřit spektrofotometricky, přičemž se sleduje oxidace tetrametylbenzidinu nebo fenolové červeně (15).

2. Fluorescence dichlorofluoresceinu

Peroxid vodíku oxiduje 2'-7'-dichlorofluorescin (DCFH) na fluoreskující látku 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF). Fluorescence se měří při vlnové délce excitace 498 nm a emise 522 nm. Tímto způsobem byla například zjišťována antioxidační aktivita Ginsenosidu Re vůči peroxidu vodíku intracelulárně (30) či metylgalátu izolovaného z extraktu *Toona sinensis* Roem. (*Meliaceae*) (31).

3. Inhibice katalázy aminotriazolem

Jednou z hlavních cest odstraňování peroxidu vodíku je v lidském organismu jeho reakce s katalázou. Meziproduktem této reakce je relativně stálý komplex I. Reakcí aminotetrazolu s komplexem I dojde k ireverzibilní inhibici katalázy. Kataláza je inhibována pouze v přítomnosti peroxidu vodíku a jeho množství se tak může detekovat sledováním aktivity katalázy (32).

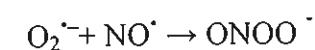
3.2.3. HYDROXYLOVÝ RADIKÁL

Obzvláště toxickým sekundárním ROS je hydroxylový radikál OH[•], který v živé hmotě okamžitě reaguje s okolními biomolekulami; jde o extrémně silné oxidační činidlo, vytrhující elektron z nenasycených mastných kyselin, atakující a hydroxylojící aminokyseliny a báze nukleových kyselin. K produkci OH[•] v organismu může docházet minimálně čtyřmi různými mechanismy.

Jednou z možných reakcí je tzv. Haberova-Weissova reakce, známá spíše jako Fentonova reakce, při níž hydroxylový radikál vzniká redukcí peroxidu vodíku v přítomnosti tranzitních kovů (dvojmocné železo Fe²⁺ nebo jednomocná měď Cu⁺) (Tab. 1-(4)) (1). Tranzitní kovy (železo či měď) se účastní vzniku ROS jen pokud nejsou bezpečně vázány v depozitních formách, jako je feritin a transferin (vazba Fe) a ceruloplazmin (vazba Cu). K uvolňování iontů železa, a pravděpodobně také mědi, katalyzujících Fentonovu reakci, může docházet např. při výrobě potravin, zejména masa (3).

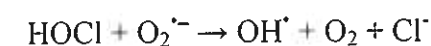
Druhým možným způsobem vzniku OH[•] je štěpení molekuly vody účinkem základního ionizujícího záření. Tímto způsobem však v organismu vzniká velmi malé, vyvážené množství OH[•].

Třetím způsobem tvorby hydroxylového radikálu je reakce superoxidu s oxidem dusnatým (NO[•]) (3). Oxid dusíku je jednou z mála molekul, která reaguje se superoxidovým radikálem velmi pohotově za vzniku peroxynitritu:



Peroxynitrit může způsobit rozsáhlé poškození (např. oxiduje -SH skupin a tak poškozují methionin), navíc se při fyziologickém pH protonuje a rozkládá na celou řadu škodlivých látek jako je dusitanový kationt (NO₂⁺), plynný volný radikál oxidu dusičitého (NO₂[•]) a hydroxylový radikál (OH[•]).

Hydroxylový radikál může být také tvořen reakcí kyseliny chlorné a superoxidového radikálu.



3.2.3.1. Stanovení hydroxylového radikálu

K produkci hydroxylového radikálu se nejčastěji využívá:

1. Fentonova reakce: viz výše
2. UV fotolýza peroxidu vodíku: $\text{H}_2\text{O}_2 + h\nu \rightarrow 2 \text{OH}^{\cdot}$ (33)
3. fotolýza různých syntetických látek např. cyklických peroxidů (34).

Detekce radikálu:

1. Reakce hydroxylového radikálu s kyselinou salicylovou

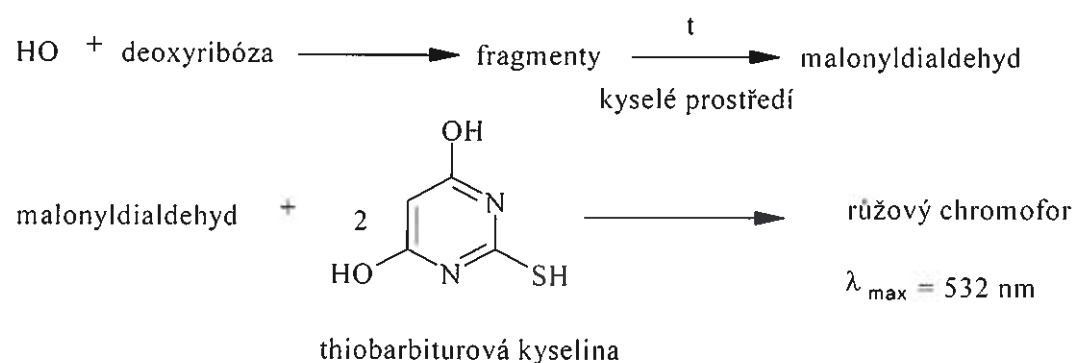
Vznikající hydroxylované deriváty kyseliny salicylové se detekují a kvantifikují metodou HPLC s UV detekcí (35) či elektrochemickou detekcí (36).

2. Reakce hydroxylového radikálu s 2,2-dimetyl-2H-pyrol-1-oxidem (DMPO)

Vzniklý adukt je detekován metodou ESR (elektronová spinová rezonance) (37) nebo HPLC ve spojení s elektrochemickou detekcí (HPLC-ECD) (33). Metoda ESR k detekci hydroxylového radikálu byla použita např. ke zjištění antiradikálových vlastností extraktů koření jako jsou pepř, muškátový oříšek, oregano a skořice (38), šípku (38) či hlavních fenolických kyselin vyskytujících se v pšenici (37).

3. Reakce hydroxylového radikálu s deoxyribózou

Vychytáváním OH[•] deoxyribózou dochází ke vzniku jejích degradačních produktů, které je možno po reakci s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) detekovat spektrofotometricky při 532 nm (39,40).



Ve zkoušce s deoxyribózou je hydroxylový radikál produkován Fentonovou reakcí. Reakční směs tvoří kyselina askorbová, H₂O₂ a Fe³⁺-EDTA. Kyselina askorbová působí jako „urychlovač“ reakce, protože zpětně redukuje železité ionty na železnaté, které mohou opět vstupovat do reakce. EDTA má za úkol chelatovat ionty železité a zabránit tak jejich vazbě na antioxidant. S EDTA tedy antioxidant (pokud má tuto schopnost) nemůže vyvázat kovy z reakce a zabránit tak chelataci tvorbě radikálu a následně i tvorbě chromogenu.

Ke zjištění schopnosti antioxidantu chelatovat ionty kovů se zkouška provádí bez EDTA. V nepřítomnosti EDTA se některé ionty železité váží přímo na deoxyribózu, ale i vázané nadále mohou katalyzovat Fentonovu reakci. Hydroxylové radikály se však tvoří přímo u deoxyribózy a rovnou ji atakují a degradují. To znamená, že antioxidant působící jako zhášec OH[•] nemůže v tomto provedení kompetovat s deoxyribózou a zabránit její degradaci, působit může pouze vyvázáním kovů z reakce a zabránit tak tvorbě samotného radikálu. Jestliže antioxidant vyváže kovy z reakce, ke snížení množství produkovaných hydroxylových radikálů dochází dvěma možnými způsoby: a) hydroxylový radikál se netvoří, neboť komplex antioxidant-kov není schopen katalýzy; b) komplex antioxidant-kov je schopen katalýzy, radikál se tvoří, ale je zachycen antioxidantem a neuvolní se do roztoku (nebo-li atakuje antioxidant a ne deoxyribózu) (3).

Výhodou této metody je možnost stanovit jak antioxidační, tak i prooxidační vlastnosti látek. Pro zjištění prooxidačních vlastností vzorku se reakce provádí bez kyseliny askorbové. Pokud má vzorek prooxidační vlastnosti – působí jako kyselina askorbová, redukuje železité ionty na železnaté, podporuje Fentonovu reakci a dochází tak ke zvýšené produkci OH[•]. Následně se tak tvoří větší množství chromoforu a absorbance se zvyšuje (39).

Test s deoxyribózou je nejčastěji využívanou metodou pro stanovení aktivity rostlinných extraktů oproti hydroxylovému radikálu. Je zahrnut například ve studiích zabývajících se antioxidační aktivitou vodných extraktů *Hypericum androsaemum* (*Guttiferae*) a *Lippia citriodora* (*Verbenaceae*) (41,42) či v práci zabývající se antioxidační aktivitou metanolového extraktu z kůry *Cinnamomum verum* (*Lauraceae*) (43).

4. Vychytávání hydroxylového radikálu specifickou chemiluminiscenční sondou indoxyl- β -glukuronidem (IBG)

IBG je po ataku hydroxylovým radikálem schopný chemiluminiscence. Zhášením OH[•] přidanými antioxidanty pak dochází ke snížení chemiluminiscence (44).

5. Reakce hydroxylového radikálu s benzoátem

Benzoát vychytává hydroxylové radikály, dochází k jeho hydroxylaci a tvoří se silně fluoreskující 3-hydroxybenzoát a 4-hydroxybenzoát. Aktivita se tedy měří fluorimetricky (45).

6. Modifikovaná “cupric ion reducing antioxidant capacity” (CUPRAC) zkouška.

Hydroxylové radikály produkované Fentonovou reakcí hydroxylují aromatické sloučeniny jako jsou p-aminobenzoát, 3,5-dimetoxybenzoát nebo 2,4-dimetoxybenzoát. Fenolické hydroxyly vzniklých oxidačních produktů těchto látek jsou poté oxidovány na odpovídající chinony činidlem Cu(II)-neocuproinem. Při této redoxní reakci se Cu(II)-neocuproin redukuje na chromogen Cu(I)-neocuproin, absorbující při vlnové délce 450 nm. Pokud má testovaná látka schopnost zhášet hydroxylové radikály, snižuje se hydroxylace sond (aromatických sloučenin) a tedy i redukce činidla Cu(II)-neocuproinu - absorbance při 450 nm se snižuje (46).

9. Reakce hydroxylového radikálu s fenoly a následná HPLC-ECD

Vzniklý produkt fenolu po ataku hydroxylovým radikálem je detekován HPLC-ECD (47).

10. Metoda ORAC

Metoda ORAC (oxygen radical absorbance capacity) se využívá k hodnocení schopnosti dané látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci (48). Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence β -fykoerytrinu po ataku radikály. Pro generování hydroxylových radikálů se používá systém $H_2O_2-Cu^{2+}$. Tato metodika se dále využívá ke zjištění reaktivity vůči peroxylovým radikálům, pro jejichž generování se využívá zejména AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid) (48). Vzhledem k tomu, že hydroxylový a peroxylový radikál patří mezi nejreaktivnější, je ORAC důležitým testem charakterizující antioxidanty (20).

Metoda ORAC byla využita např. ke stanovení antioxidační aktivity rostlinných druhů využívaných v lidovém léčitelství Amazonie s cílem nalézt vhodný zdroj přírodních antioxidantů (49). Rovněž byla touto metodou testována antioxidační aktivita různých vín (50).

10. Reakce hydroxylového radikálu s fluoresceinem (metoda ORAC-FL)

Tato metoda zjišťuje zejména schopnost testované látky chelátovat kovy a zabránit tak tvorbě OH^\cdot ve Fentonově reakci. Do Fentonovy reakce přidáný fluorescein se oxiduje, přičemž ztrácí fluorescenci. Antioxidant schopný vyvézt kov z této reakce tak zabráňuje ztrátě fluorescence fluoresceinu. Pro tuto zkoušku se z testovaných kovů ukázaly jako nejvhodnější kobaltnaté ionty (51). Metodika ORAC s využitím fluoresceinu jako fluorescenční sondy byla využita ve studii zabývající se antioxidační aktivitou extraktu ze slupky a dřevě granátového jablka (*Punica granatum*, *Punicaceae*) (52) či ke zjištění antioxidační aktivity šťávy z červených i bílých vinných hroznů a vinného octa (*Vitis vinifera*, *Vitaceae*) (53).

3.2.4. KYSELINA CHLORNÁ

Kyselinu chlornou (HOCl) syntetizují neutrofilní granulocyty (polymorfonukleáry) pomocí své myeloperoxidázy: $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HClO + H_2O$

Podobný enzym obsahují lidské eosinofily, tento enzym preferuje bromidové ionty před chloridovými a pravděpodobně produkuje kyselinu bromnou (3). Kyselina chlorná je silný antioxidant, který polymorfonukleáry používají spolu s dalšími ROS a RNS jako baktericidní prostředek (1). HOCl produkovaná mimo fagocytující buňky však může způsobit tkáňové poškození. Například kyselina chlorná oxiduje důležité methioninové zbytky v α_1 -antiproteináze (dříve nazývané α_1 -antitrypsin), která v tělních tekutinách člověka působí jako inhibitor proteáz serinu, jako je elastáza (3).

Kyselina chlorná se může vyskytovat v potravinách - její sodná sůl (NaOCl) se používá pro bělení; vznikat může také ozařováním potravin s obsahem chloridových iontů (3).

3.2.4.1. Metody stanovení aktivity vůči kyselině chlorné

Antioxidant může zhaset HOCl a/nebo inhibovat produkci HOCl inaktivací myeloperoxidázy.

Inhibice myeloperoxidázy se testuje např. reakcí myeloperoxidázy s guajakolem v přítomnosti H_2O_2 : myeloperoxidáza katalyzuje oxidaci guajakolu na barevný chromogen a pokud testovaná látka inhibuje enzym, dochází ke snížení tvorby chromogenu, a tím i absorbance. Jestliže se v této zkoušce ukáže testovaná látka aktivní vůči myeloperoxidáze, je třeba zjistit zda daná látka účinkuje inhibicí enzymu nebo zda-li pouze nekompetuje s guajakolem jako další možný substrát.

Pro testování látek na zhasení kyseliny chlorné se k produkci HOCl využívá buď systém myeloperoxidáza/ H_2O_2/Cl^- nebo ji lze připravit jednodušeji z chlornanu sodného (Na^+OCl^-) úpravou pH roztoku na 6,2 (3).

Dobrym zhasěčem kyseliny chlorné a substrátem pro myeloperoxidázu je kyselina askorbová nebo většina thiolů. Také některé fenolické látky (jako vanilin, kyselina ferulová, katechiny, kyselina karnosová, karnosol a propylgalát) reagují velice rychle s HOCl a mohou tak zabránit degradaci α_1 -antiproteinázy a jiných látek citlivých na oxidativní poškození *in vitro* (3).

1. Reakce kyseliny chlorné s α_1 -antiproteinázou

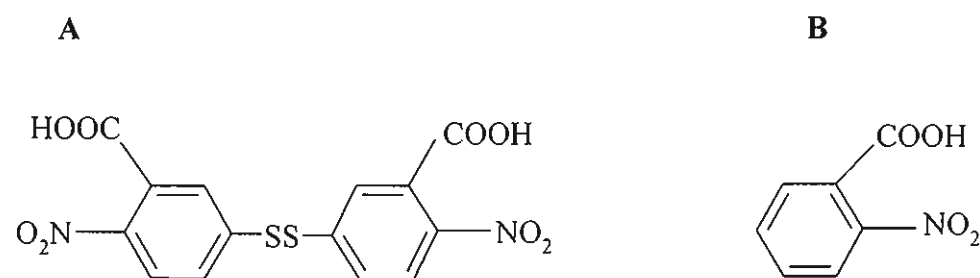
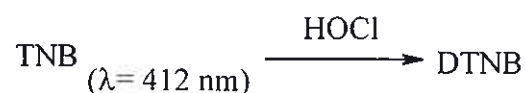
Aktivita antioxidantu se testuje sledováním celé kaskády reakcí: testovaný antioxidant se smíchá s α_1 -antiproteinázou vysoce citlivou vůči kyselině chlorné, následně se přidá HOCl. Látka schopná účinně zhaset HOCl zabrání oxidaci α_1 -antiproteinázy a tím i následně inhibici elastázy. Elastáza způsobuje hydrolýzu syntetického substrátu N-sukcinyl(Ala)₃-p-nitroanilidu (SANA), přičemž se uvolňuje chromogen p-nitroanilin. Inhibicí elastázy tedy nedochází k hydrolýze SANA a absorbance se snižuje v závislosti na aktivitě testované látky (54). Reakce se sleduje spektrofotometricky. Při této zkoušce je nutno provést současně kontrolní zkoušky, aby se prokázalo, zda testovaná látka :

- neinhibuje elastázu
- neinterferuje se schopností α_1 -antiproteinázy inaktivovat elastázu
- neobnovuje α_1 -antiproteinázu, již předtím inaktivovanou kyselinou chlornou (3).

Reakce kyseliny chlorné s α_1 -antiproteinázou byla aplikována např. ke zjištění antioxidačních vlastností odvaru z kůry *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae), která je tradiční bylinou užívanou hojně v lidovém léčitelství Peru a je známá především pro své protizánětlivé účinky (55).

2. Reakce kyseliny chlorné s kyselinou 5-thio-2-nitrobenzoovou (TNB)

Kyselina chlorná indukuje konverzi kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové (TNB), která vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 412 nm, na kyselinu 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou (DNTB), jejíž absorpční maximum je při 325 nm (Obr. 2). Aktivita vůči kyselině chlorné se zjišťuje spektrofotometricky sledováním absorbance při 412 nm.



Obr. 2: (A) DNTB a (B) TNB

Metoda založená na reakci kyseliny chlorné s kyselinou 5-thio-2-nitrobenzoovou patří mezi nejčastější způsoby stanovení aktivity vůči kyselině chlorné. Zahrnuta je ve studiích zabývajících se antioxidační aktivitou extraktů např. *Brassica oleracea* (Brassicaceae), *Hypericum androsaemum* (Guttiferae), *Lippia citriodora* (Verbenaceae), *Centaurium erythraea* (Gentianaceae) (5,41,42,56), které se vyznačují vysokým obsahem fenolických látek, zejména flavonoidů a fenolických kyselin.

3. Reakce kyseliny chlorné s taurinem

Kyselina chlorná v této zkoušce chloruje taurin a reakce je měřena spektrofotometricky při 350 nm. Takto byly testovány antioxidační vlastnosti vodného extraktu z kořenu *Microdermis keayana* (Pandaceae) (16) či extraktu z osemení a z mouky pohanky *Fagopyrum vulgare* (Polygonaceae) (57).

4. Reakce kyseliny chlorné s DNA, RNA

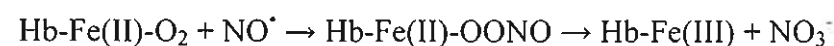
Kyselina chlorná indukuje tvorbu různě modifikovaných chlorovaných bazí (8-chloroguanin, 8-chloroadenin a 5-chlorocytosin) DNA a RNA. K jejich detekci byla vyvinuta metoda HPLC spojená s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) (58).

3.3. REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU A METODY JEJICH STANOVENÍ

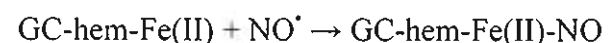
3.3.1. OXID DUSNATÝ

Přestože je oxid dusnatý NO[•] velmi jednoduchá molekula, syntetizuje se v těle poměrně složitým enzymovým mechanismem. V lidském těle má oxid dusnatý řadu důležitých fyziologických funkcí: podílí se na procesech vazodilatace, neurotransmise, synaptické plasticitě a paměti. Na druhé straně, jeho nadměrná produkce způsobuje rozvoj řady onemocnění a patologických stavů. Jedná se o fragmentaci DNA, buněčné poškození, buněčnou smrt neuronů. NO[•] také vykazuje neurotoxicitu a je prostředníkem při patofyziologických procesech, jako je mozková ischemie, epilepsie, Alzheimerova, Parkinsonova choroba a některá neurodegenerativní onemocnění (59). NO[•] má *in vivo* velmi krátký biologický poločas – pouze několik sekund. Příčinou však není interakce s biologickými molekulami, nýbrž skutečnost, že je pohotově a průběžně vychytáván v erythrocytech. Pohotově totiž reaguje se železem oxyhemoglobinu. Vzniká

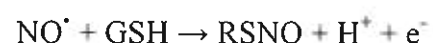
methemoglobin a nitrát a jde o jeden z neúčinnějších způsobů inaktivace NO^* a o jednu z podmínek jeho regulační funkce *in vivo*:



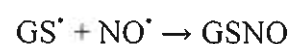
Oxid dusnatý se stejně pohotově navazuje na hemové železo enzymu guanylátcyklázy, což je podstata stimulace syntézy cGMP, vedoucí k relaxaci hladkého svalstva cév (vazodilataci), a mechanismu dalších regulací (1):



In vivo v přítomnosti akceptorů elektronů (NO_2^* , tranzitních kovů) se oxid dusnatý snadno slučuje s fenoly (tyroxinem), thioly (cysteinem, GSH, albuminem) a se sekundárními aminy:



Glutathion (GSH) se snadno metabolizuje na radikál GS^* a ten dává s NO^* nitrosothiol:

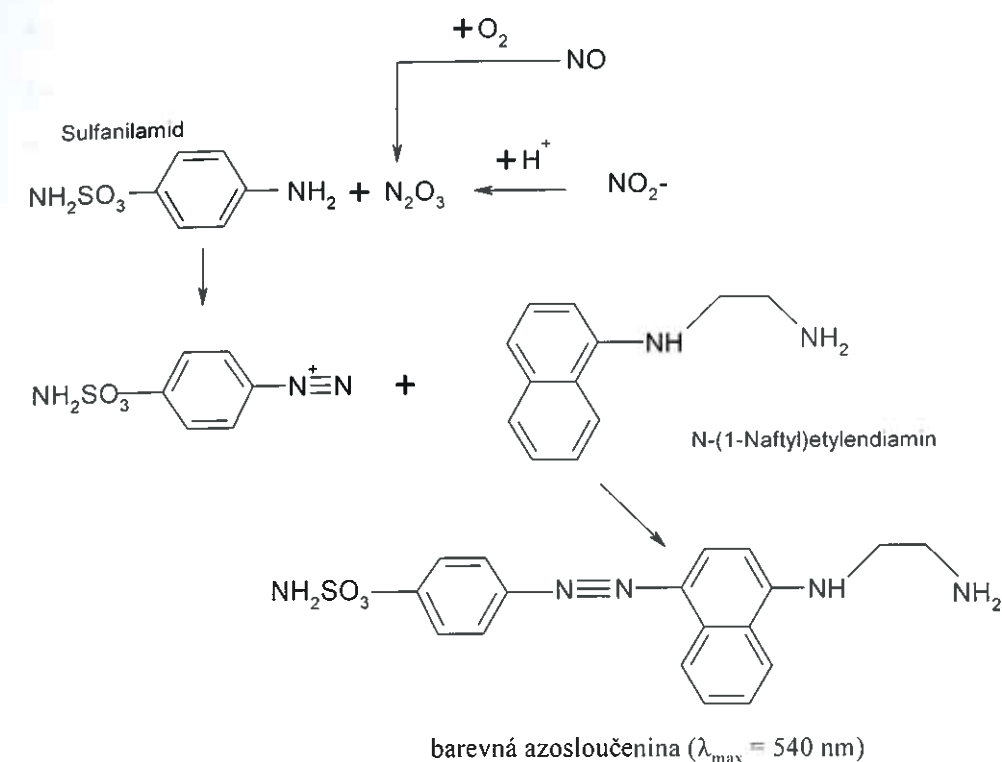


Reakcí se sulfhydrylovými skupinami (-SH) cysteinu, glutathionu, albuminu a dalších látek tak oxid dusnatý tvoří o něco stálejší nitrosothioly (neboli thionitry); tyto látky mají biologický poločas kolem 40 minut a jsou tak zřejmě transportní formou NO^* . Slouží jako přenašeče biologicky aktivního oxidu dusnatého a mohou tak předávat nitrosyl NO^* jiným molekulám (1).

3.3.1.1. Metody stanovení aktivity vůči oxidu dusnatému

1. Stanovení s využitím Griessova činidla

Metoda se zakládá na nepřímém stanovení NO^* : stanovují se stabilní dekompoziční produkty NO^* - dusičnany a dusitany. Nitroprusid sodný ve vodném roztoku za fyziologického pH spontánně produkuje oxid dusnatý, který po reakci se vzdušným kyslíkem produkuje dusitanové ionty. Ty mohou být následně stanoveny Griessovým činidlem. Griessovo činidlo představuje roztok sulfanilamidu a naftyletylendiaminu v 2% kyselině fosforečné. Zhášeči NO^* kompetují s kyslíkem, což vede ke snížené produkci NO^* . Griessova reakce je diazotací o dvou krocích, kde nitrační činidlo (např. N_2O_3), tvořené reakcí NO s kyslíkem (popř. z dusitanu přes kyselinu dusitou) reaguje s kyselinou sulfanilovou za tvorby diazoniového kationtu, který následně kopuluje s N-(1-naftyl)etylendiaminem za tvorby azosloučeniny vykazující maximum absorpce při 543 nm (Obr. 3) (15,60).



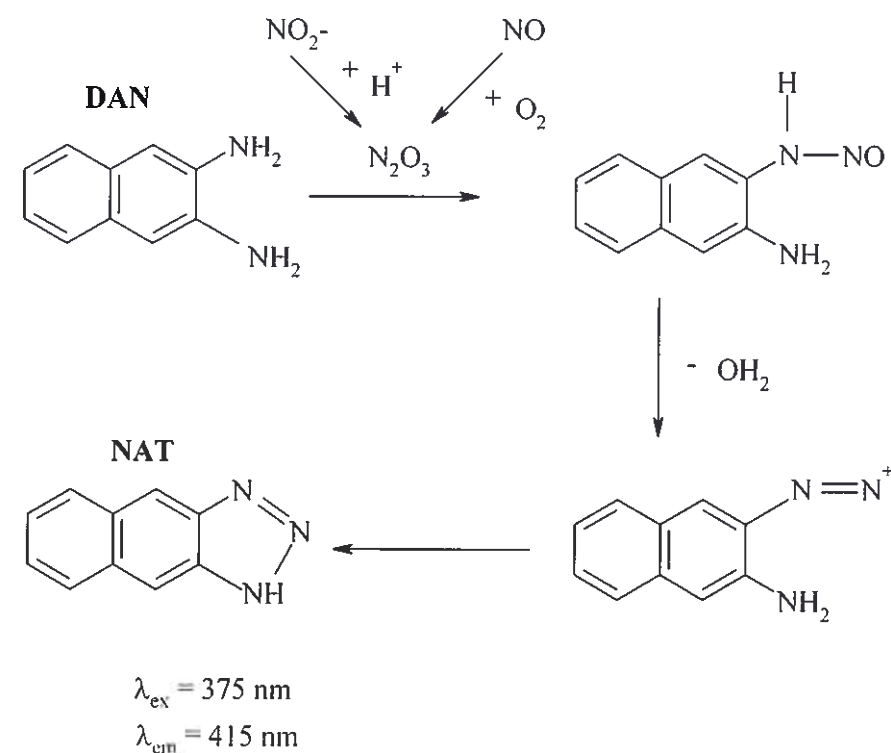
Obr. 3: Griessova reakce

Reakce s Griessovým činidlem se pro studium účinku rostlinných extraktů na oxid dusnatý *in vitro* využívá zdaleka nejčastěji. Takto byl zjišťován účinek na oxid dusnatý např. u lyofilizovaného extraktu z vinných hroznů (hybridu *Vitis aestivalis-cinerea* × *Vitis vinifera*, Vitaceae) (61) či u nového kultivaru citrusu (hybrid *Citrus grandis* × *C. paradisi*, Rutaceae) (62).

2. Stanovení oxidu dusnatého s využitím fluorimetrie

(a) Reakce s diaminonaftalenem

Tato metoda je velice přesná, univerzální a oproti Griessově zkoušce citlivější. Využívá reakce aromatické diaminosloučeniny 2,3-diaminonaftalenu (DAN) s nitračním činidlem N_2O_3 , tvořeným reakcí NO s kyslíkem (popř. z dusitanu přes kyselinu dusitou) (Obr. 4). Vzniklý produkt 2,3-naftotriazol (NAT) je vysoce fluoreskující (15).



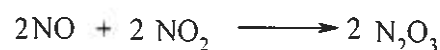
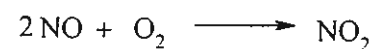
Obr. 4: Fluorimetrická detekce NO nebo dusitanů s využitím diaminonaftalenu (DAN)

(b) Reakce s diaminofluoresceinem-2

Diaminofluorescein-2 (DAF-2) se využívá ke zjištění přítomnosti NO *in vitro* a *in situ*. Podobně jako u postupu s diaminonaftalénem dochází nitrací (pomocí N₂O₃) diaminoskupiny DAF k tvorbě fluoreskujícího triazolu (DAF-2 triazolu) (15).

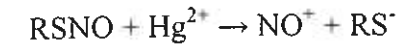
Stanovení S-nitrosothiolů kolorimetrickými a fluorimetrickými metodami

Je známé, že autooxidací oxidu dusnatého v přítomnosti thiolů (RSH) vznikají nitrosothioly (RSNOs):



Různé RSNO stimuluji guanylátcyklázu, čímž zapříčiňují vazorelaxaci. Některé studie také prokázaly, že sloučeniny S-nitrosohemoglobinu se podílejí na homeostáze tonu cév a transportu kyslíku (15).

K detekci RSNO se nejčastěji využívá reakce RSNO se rtuťnatými ionty, při níž dochází k uvolnění nitračního činidla - nitrosionia (NO⁺).



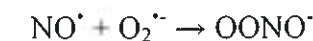
Jeho spontánní degradací vzniká dusitan či NO, které mohou být stanovovány chemiluminiscenčními nebo HPLC metodami.

Další možnost detekce RSNO skýtají kolorimetrické metody, které využívají Griessovi reakce (viz Obr. 3) ke stanovení dusitanu, tvořeného z RSNO po reakci s chloridem měďnatým. Pro měření dusitanu lze využít také fluorescenční metodu, založenou na měření fluorescence triazolového derivátu z DAN (viz Obr. 4). Pokud srovnáme obě metody z hlediska detekčního limitu, je metoda fluorescenční účinnější s možností detekce RSNO již v rozmezí hodnot 50-1000 nM, kolorimetrická 0,5-100 μM RSNO (15).

Tyto dvě metody byly s určitými modifikacemi využity ke stanovení vysokomolekulárních a nízkomolekulárních RSNO v lidské a potkaní plazmě a S-nitrosolovaných derivátů v lidském a potkaním hemoglobinu (63,64).

3.3.2. PEROXYNITRIT

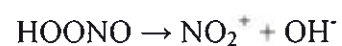
Reakcí oxidu dusnatého se superoxidem vzniká toxický produkt - peroxynitrit:



Významné hladiny (v řádu μmolů) může peroxynitrit dosáhnout při intenzivní syntéze NO[•] a O₂^{•-} například aktivovanými polymorfonukleáry. Peroxynitrit je oxidačním činidlem. Za fyziologického pH se protonovaný peroxynitrit jakožto kyselina peroxydusitá rozkládá na hydroxylový radikál a radikál oxidu dusičitého:



Peroxynitrit je *in vivo* odpovědný za nitraci a hydroxylaci aminokyseliny tyrozinu. Tranzitní kovy včetně kovů aktivních center superoxididizmutázy a myeloperoxidázy katalyzují jeho heterolytické štěpení na hydroxidový anion a nitroniový kation, kterému je tradičně připisována schopnost napadnout fenolové sloučeniny a *in vivo* v proteinech měnit například tyrozin na 3-nitrotyrozin.



Katalyzátorem této reakce je zřejmě oxid uhličitý, který rychle reaguje s peroxynitritem za vzniku oxidujících a nitrujících meziproductů včetně NO_2^+ a $\text{CO}_3^{\cdot-}$. Kromě toho se tyto radikály ve vodném prostředí snadno přeměňují na dusitan (NO_2^-), dusičnan (NO_3^-), CO_2 a H_2O_2 (1).

3.3.2.1. Metody stanovení peroxynitritu

1. Nitrace fenolických látek

Jelikož peroxynitrit způsobuje nitraci a oxidaci fenolických látek jako jsou tyrozin či p-hydroxyfenyloctová kyselina (p-HPA), jeho stanovení lze provádět měřením produktů reakce peroxynitritu a těchto látek. 3-nitro-pHPA a 3-nitrotyrozin jsou stabilní produkty které lze snadno stanovit spektrofotometricky: mají charakteristickou absorpenci v rozmezí vlnových délek 350-450 nm. Přesnějšími metodikami pro detekci 3-nitro-pHPA a 3-nitrotyrozinu jsou HPLC či GC techniky separace ve spojení s variabilními detektory (UV/VIS, EC, fluorescenční, MS) (65) či imunochemické stanovení 3-nitrotyrozinu jako produktu nitrační aktivity peroxynitritu (66).

Tato metoda byla využita např. ke zjištění schopnosti kyseliny sinapové (3,5-dimetoxy-4-hydroxyskořicové kyseliny) izolované z *Brassica juncea* (*Brassicaceae*) inhibovat nitraci tyrozinu peroxynitritem (67). Kerry a Rice-Evans se ve své studii zaměřili na studium mechanismu účinku kyseliny kávové s peroxynitritem (68). Kyselina kávová v této studii přednostně inhibovala nitraci tyrozinu poskytnutím elektronu, přičemž ostatní sledované hydroxyskořicové kyseliny (kyselina ferulová a p-kumarová) inhibovali nitraci tyrozinu kompetitivně, tedy samy byly substrátem pro peroxynitrit. Další práce stejných autorů se zabývala schopností fenolických antioxidantů zabránit oxidaci dopaminu peroxynitritem, zejména z důvodu, že hydroxyskořicové kyseliny (především kyselina kávová) jsou strukturálně dopaminu velmi podobné a mohou tedy účinkovat kompeticí o substrát (69).

2. Oxidace fluorescenčních sond

Nejčastěji se využívají dvě fluorescenční sondy, dichlorofluorescein (DCFH) a dihydrorhodamin (DHR), které dvouelektrodovou oxidací poskytují silně fluoreskující produkty dichlorofluorescein (DCF; $\lambda_{\text{ex}} = 502 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 523 \text{ nm}$) a rhodamin (RH;

$\lambda_{\text{ex}} = 500 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 536 \text{ nm}$). Sledováním oxidace dihydrorhodaminu byla zjišťována schopnost extraktu z *Brassica juncea* zhaset peroxynitrit (67).

3. Chemiluminiscenční sondy

Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindion) je chemiluminiscenční sondou široce využívanou pro detekci různých kyslíkových radikálů (20). Tato látka byla v mnohých studiích úspěšně využita rovněž pro stanovení peroxynitritu na buněčné i orgánové úrovni (70,71).

5. Reakce štěpných produktů ONOOH s aromatickými látkami

Štěpením ONOOH vznikají hydroxylové radikály (OH^{\cdot}) a dusitanové radikály (NO_2^{\cdot}), které způsobují hydroxylaci a nitraci aromatických látek jako jsou benzoát, fenol, fenylalanin a salicylát (65). Produkty jsou stanovovány různými postupy (72,73).

5. Stanovení produktů oxidace peroxynitritem elektronovou spinovou rezonancí

„ESR-spin trapping“ techniky se osvědčily zejména ke studiu dekompozičních produktů peroxynitritu a jeho reakcí s cílovými molekulami (74,75). Rozpadem peroxynitritu vzniká OH^{\cdot} , který je vycytáván 5,5-dimetyl-1-pyrolin-N-oxidem (DMPO) a stabilní adukt DMPO-OH je poté detekován ESR. Vedle DMPO se využívá mnoho dalších lapačů OH^{\cdot} , např. C-fenyl N-tert-butylnitron, α -4-pyridinyl-1-oxid N-tert-butylnitron (65).

6. Oxidace a tvorba chromoforů

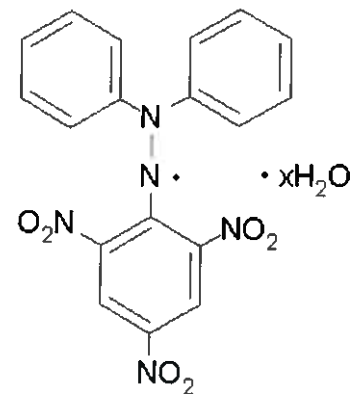
Ke stanovení peroxynitritu lze také využít takové sloučeniny, u kterých oxidací dochází k výrazné změně absorpance. K detekci OH^{\cdot} , který vzniká rozpadem ONOOH se využívají karmínová kyselina, gallocyanin, pyrogalolová červeň (76). ABTS (77) či ferrokyanid (78).

Přímo s peroxynitritem reagují různou rychlostí další látky jako jsou jodid, Ni^{2+} cyklam (64) a redukovaný cytochrom c (cytochrom c^{2+}) (79,65).

3.4. SYNTETICKÉ RADIKÁLY A METODY JEJICH STANOVENÍ

3.4.1. DPPH

Metoda používající DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Obr. 5) je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. Spočívá v reakci testované látky s difenylpicrylhydrazylem, přičemž při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku difenylpicrylhydrazinu (DPPH-H). Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky při vlnové délce 517 nm. Dalším možným způsobem detekce je elektronová spinová rezonance (ESR) (80) nebo HPLC (81). Použití detekce HPLC, při které je hodnocen pík radikálu DPPH, je výhodné zvláště u barevných vzorků. Radikálová aktivita se u směsných vzorků nejčastěji vyjadřuje v hodnotě IC_{50} (koncentrace vzorku schopná zhášet 50 % DPPH) nebo v ekvivalentech askorbové kyseliny (82) nebo v jednotkách standardu Troloxu (83). DPPH se používá také k detekci TLC pro screening zhášecí aktivity směsných vzorků (84). Stanovení antiradikálové aktivity lze také kombinovat se separací látek ze směsi metodou HPLC (20).



Obr. 5: Molekula DPPH radikálu

3.4.2. GALVINOXYL

K metodám využívajícím syntetické stabilní radikály patří také test s galvinoxylem (2,6-di-*tert*-butyl-4-[(3,5-di-*tert*-butyl-4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden)metyl]fenoxyl).

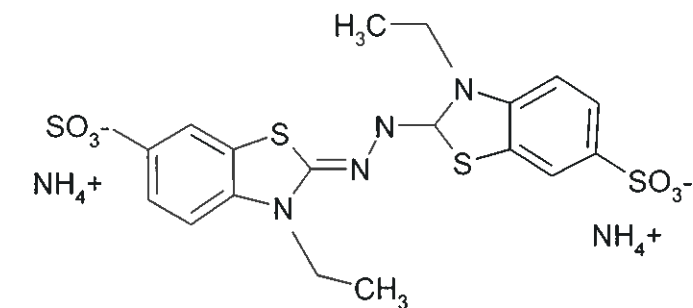
Princip metody spočívá v redukci stabilního radikálu galvinoxylu látkami poskytujícími vodík podobně jako při testu DPPH. Reakce se sleduje spektrofotometricky při vlnové délce 428 nm nebo pomocí ESR (85).

3.4.3. FREMYHO SŮL

Pro hodnocení schopnosti látek poskytovat vodíkový atom nebo elektron se používá také syntetický volný radikál Fremyho sůl (nitrosodisulfonan draselný), přičemž detekce a hodnocení reakce se provádí pomocí ESR (85).

3.4.4. ABTS

Jedná se o jednu ze základních a nepoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Testuje se schopnost vzorku či látek zhášet radikál ABTS (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát) (Obr. 6). Metoda je také označována jako metoda TEAC (Trolox ekvivalent antioxidant capacity) (86), vzhledem k tomu, že výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Reakce se sleduje spektrofotometricky na základě změn spektra ABTS nejčastěji při 734 nm. Stanovení celkové antioxidační aktivity lze provádět i komerčně vyráběnými sety (např. Radox Laboratories Ltd.) (87). Používá se i sériově na mikrotitračních destičkách.



Obr. 6: Molekula ABTS

ABTS je možné produkovat několika způsoby:

- System ABTS/H₂O₂/peroxidáza (88)
- System ABTS/metmyoglobin/H₂O₂ (89)
- Chemická oxidace ABTS - peroxidisíran draselný, oxid manganicitý (90,91).

Pro vlastní stanovení se užívají 2 postupy. V prvním se antioxidant přidává do reakční směsi, ve které byl již vytvořen radikál ABTS, při druhém postupu je antioxidant v reakční směsi přítomen při generování radikálu ABTS. Častěji se používá uspořádání,

při němž se antioxidant přidává k radikálu ABTS již vyprodukovanému pomocí peroxidázy (20). Celková antioxidační aktivita vzorků se hodnotí parametrem TEAC (86). Označuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu Troloxu. Pro čisté látky je TEAC definována jako milimolární koncentrace Troloxu vykazující stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka při koncentraci 1 mmol.l⁻¹. Pro směsi TEAC udává koncentraci Troloxu (mmol.l⁻¹), která je rovná antioxidační aktivitě vzorku (92).

Tato metoda používající ABTS byla popsána pro stanovení celkové antioxidační aktivity jak hydrofilních tak lipofilních vzorků (88,90). Antioxidační aktivita lze sledovat také pomocí elektronové spinové rezonance (93). Byla také vypracována metoda stanovení antiradikálové aktivity vzorků vůči ABTS radikálu spojena on-line s HPLC separací látek (94,95).

3.5. LIPIDOVÁ PEROXIDACE A METODY JEJÍHO STANOVENÍ

Lipidová peroxidace vyvolaná volnými radikály je jedním z nejvýznamnějších patologických pochodů v organismu. Proto se řada metod stanovující antiradikálové účinky vzorku zaměřuje na testování inhibičních účinků právě na lipidovou peroxidaci. Látky potlačující lipidovou peroxidaci mohou eliminovat jak iniciační kyslíkové radikály (OH[•]), tak sekundárně vznikající radikálové meziprodukty (peroxyl, alkoxy) a mohou též působit jako látky chelatuující ionty přechodných kovů. Navíc je účinek *in vivo* ovlivněn lipofilitou antioxidantu. Bylo vyvinuto mnoho metod hodnotících vliv antioxidantů na lipidovou peroxidaci, od nejjednodušších, které jsou prováděny s jednoduchými lipidy a v jednoduchých fázových systémech, až po složitější biologické metody stimulující situaci *in vivo* a využívající biologické membrány jako matrici. Častým postupem je užití fosfolipidových liposomů (96). Jinou možností je studium na mikrosomech (97). Další modifikací je sledování lipidové peroxidace na mitochondriích (98) nebo LDL-lipoproteinech (99).

Metody založené na detekci produktů lipidové peroxidace:

- 1) Detekce produktů peroxidace kyseliny linolové

Nejčastěji se jako iniciátor peroxidace kyseliny linolové používá 2,2'-azobis(2-amidinopropan) hydrochlorid (AAPH) (86) a produkty radikálové reakce jsou stanovovány spektrofotometricky při 234 nm. Metodu lze různě modifikovat, co se týče přípravy lipidové fáze či způsobu detekce (100-102).

- 2) Detekce produktů spřažené peroxidace β-karotenu a linolové kyseliny vzdušným kyslíkem (metoda odbarvování β-karotenu) (103,104)

Antioxidační účinek látek je hodnocen spektrofotometricky při vlnové délce 470 nm podle spotřeby β-karotenu. Provedení je možné také na mikrotitračních destičkách (105).

- 3) Detekce malonyldialdehydu: Metoda TBA-MDA

Je jednou z nejužívanějších metod k hodnocení schopnosti látek eliminovat lipidovou peroxidaci. Tato metoda je založena na stanovení jednoho ze sekundárních produktů lipidové peroxidace malonyldialdehydu (MDA) na základě jeho barevné reakce s kyselinou thiobarbiturovou (TBA), měří se absorbance při 532 nm. Metoda je kritizována pro svou nespecifičnost, neboť zahrnuje stanovení všech látek reagujících s TBA (TBARs produkty) (106). Přesnější výsledky poskytuje vyhodnocení množství aduktů TBA-MDA pomocí HPLC (107).

Tato metoda našla široké uplatnění v hodnocení schopnosti rostlinných extraktů eliminovat lipidovou peroxidaci. Byla aplikována např. pro studium antioxidačních účinků různých indických druhů zeleniny (108), extraktu z *Hypericum perforatum* (Clusiaceae) (109) či extraktů z pohanky, pšenice a žita (110) a mnoha dalších.

3.6. METODY HODNOTÍCÍ REDOXNÍ VLASTNOSTI LÁTEK

3.6.1. METODA FRAP

Metoda FRAP čili ferric reducing antioxidant power je založena na principu redoxní reakce (111). Při této metodě antioxidanty ze vzorku redukují komplex Fe³⁺-2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin (Fe³⁺-TPTZ). Redukcí vzniká komplex Fe²⁺-TPTZ, což se projeví nárůstem absorbance při 593 nm. Metoda má své limity spočívající v tom, že měření probíhá za nefyziologicky nízkého pH = 3,6; nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolické látky a thioly, navíc vznikající Fe²⁺ je reaktantem Fentonovy

reakce. Metoda FRAP tedy postihuje pouze schopnost látek redukovat ion Fe^{3+} a nemusí odrážet celkovou antioxidační aktivitu vzorku (20).

3.6.2. CYKLICKÁ VOLTAMETRIE

Redoxní vlastnosti látek lze také hodnotit cyklickou voltametrií, která indikuje schopnost látek odštěpovat elektrony (112). Při této metodě se na pracovní elektrodu vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a současně se sledují proudové odezvy v roztoku studované látky. Získaný záznam zachycuje křivka - tzv. cyklický voltamogram. Redukční schopnost látek se vyhodnocuje dvěma parametry, a to z potenciálu anodického oxidačního píku E_A a jeho anodického proudu I_A . Čím je nižší hodnota E_A , tím látka snadněji odevzdává elektrony a je potenciálně lepším antioxidantem. Z hodnoty výšky proudu anodického píku I_A je možné určit koncentraci látek. Cyklická voltametrie je vhodná pro získání informace, zda látka je schopna snadno odevzdávat elektrony a poté je možné zvolit určitou metodu na stanovení antioxidační kapacity (20). Studie prokázaly, že v řadě případů hodnoty E_A korelují s antioxidační aktivitou látek určenou jinými metodami, např. lipoperoxidací (112).

3.6.3. HPLC METODY S ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ

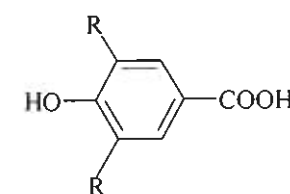
K detekci elektroaktivních látek lze velmi výhodně využít ampérometrické nebo coulochemické detektory při analýze HPLC (HPLC-ECD). Při HPLC-ECD se na pracovní elektrodu detektoru vkládá určitý kladný potenciál. Pík látky se projeví pouze tehdy, je-li látka při tomto potenciálu oxidována. Látku tak lze charakterizovat nejen retenčním časem, ale i potenciálem, při kterém se oxiduje. To umožňuje analyzovat komplexní směsi a identifikovat v nich jednotlivé účinné antioxidační komponenty na základě hodnoty potenciálu aplikovaného na elektrodu (112). Při analýze neruší zbarvení směsí, ale je nutno dodržet vysokou čistotu reagentů v mobilní fázi (včetně snížení koncentrace stopových prvků). Hodnocení antioxidačních vlastností látek pomocí HPLC-ECD koreluje s různými jinými metodami na testování celkové antioxidační aktivity látek, např. s metodou DPPH (112,113).

3.7. FENOLICKÉ LÁTKY - FLAVONOIDY A FENOLICKÉ KYSELINY

Fenolické látky tvoří velmi početnou a rozšířenou skupinu rostlinných metabolitů. Ačkoliv rostlinné fenoly jsou velmi rozmanité, většina z nich má stejný biogenetický základ: aminokyselinu fenylalanin nebo tyrozin. Tyto aminokyseliny jsou deaminovány na kyselinu skořicovou, která je výchozí látkou pro syntézu fenylpropanoidů. Klíčovým krokem v biosyntéze fenylpropanoidů je zavedení jedné nebo více hydroxylových skupin na benzenové jádro. Tyto látky jsou tedy odvozeny od základní stavební jednotky: fenylpropanové jednotky $\text{C}_6\text{-C}_3$. Touto biosyntetickou cestou vzniká celá řada rostlinných fenolů: skořicová kyselina ($\text{C}_6\text{-C}_3$), benzoové kyseliny ($\text{C}_6\text{-C}_1$), flavonoidy ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$), proanthocyany ($((\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6)_n)$), kumariny ($\text{C}_6\text{-C}_3$), stilbeny ($\text{C}_6\text{-C}_2\text{-C}_6$), lignany ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_3\text{-C}_6$) a ligniny ($((\text{C}_6\text{-C}_3)_n)$) (Obr. 7-8).

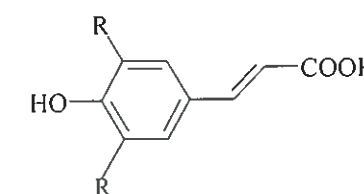
Fenolické kyseliny

Deriváty kyseliny benzoové



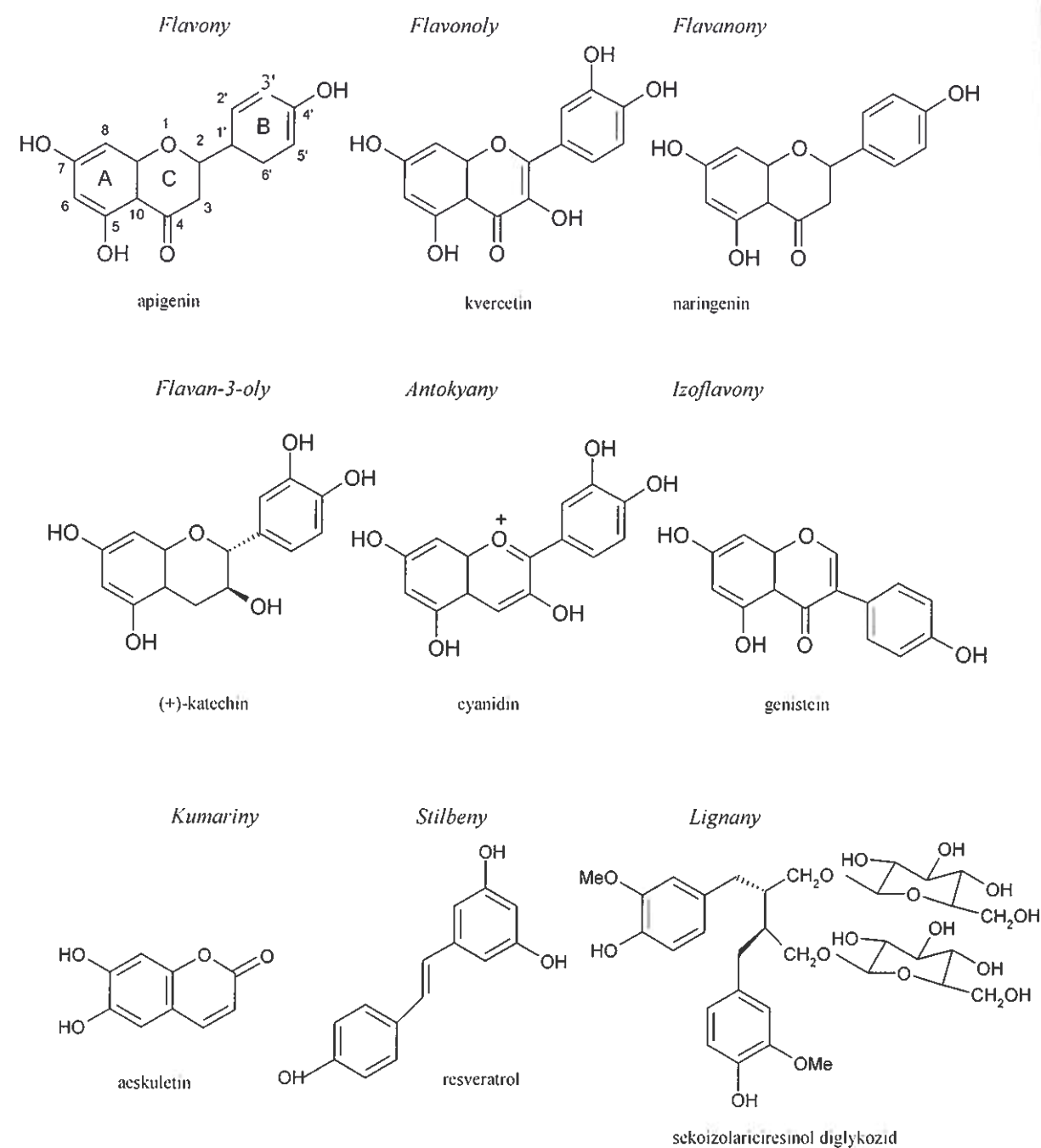
$R = R' = \text{H}$; *p*-hydroxybenzoová kyselina

Deriváty kyseliny skořicové



$R = R' = \text{H}$; *p*-kumarová kyselina
 $R = \text{OH}$, $R' = \text{H}$; kávová kyselina
 $R = \text{OCH}_3$, $R' = \text{H}$; ferulová kyselina
 $R = R' = \text{OCH}_3$; sinapová kyselina

Obr. 7: Struktura vybraných fenolických kyselin

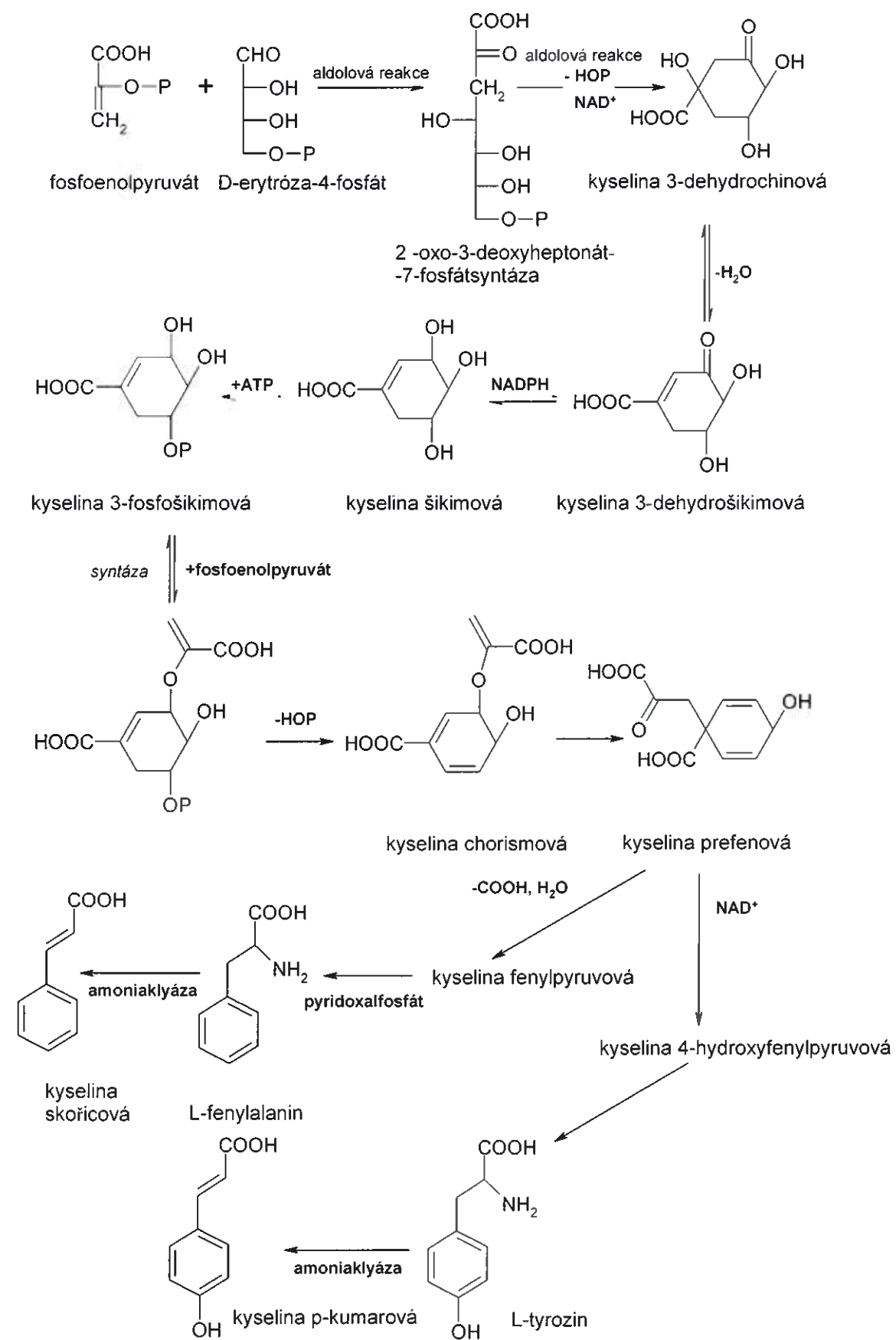


Obr. 8: Struktura vybraných polyfenolických látek

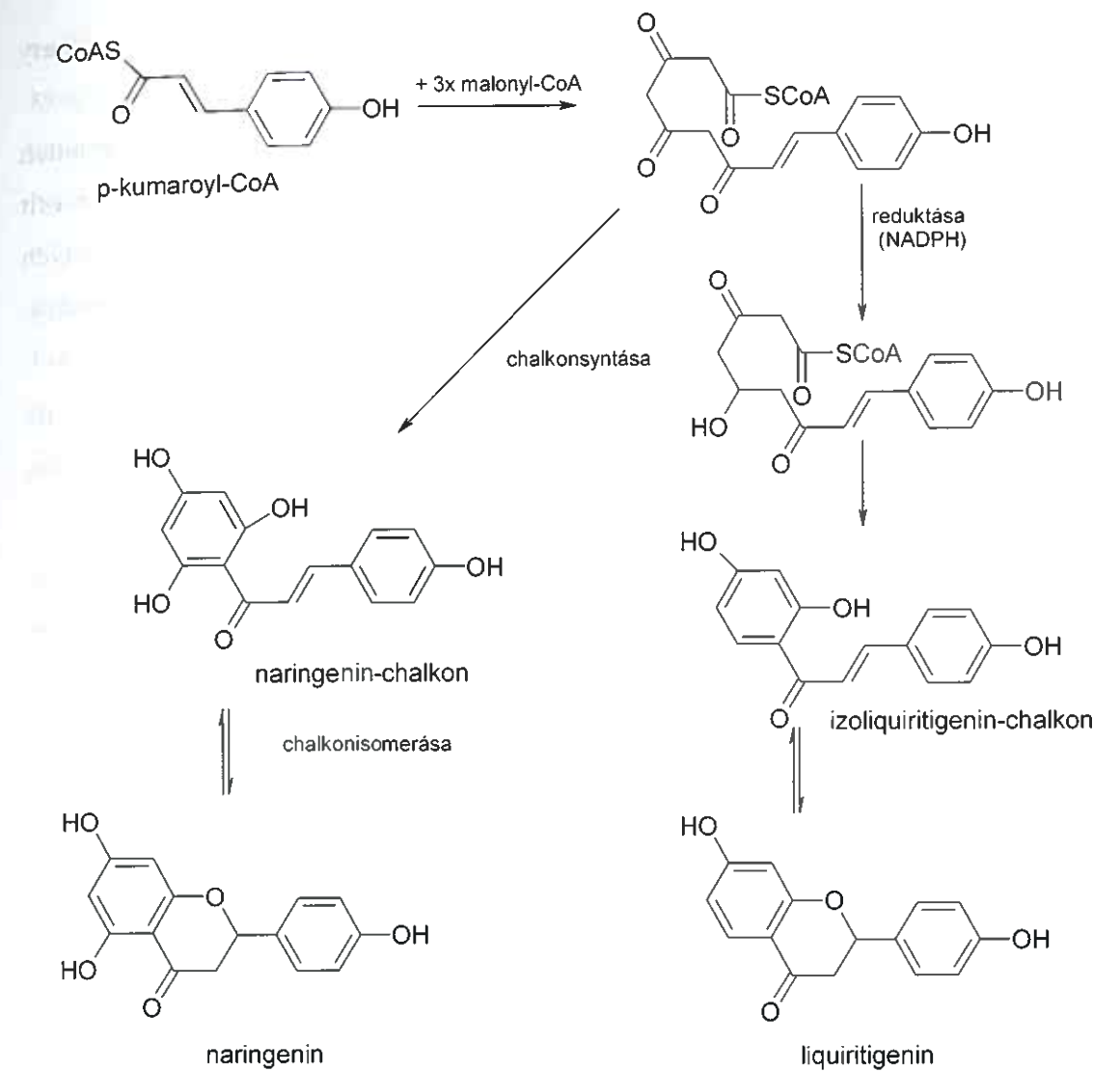
3.7.1. BIOSYNTÉZA FLAVONOIDŮ

V rostlinách vznikají flavonoidy kondenzací polyacetátu a aromatických aminokyselin jako je fenylalanin a tyrozin. Tyto sloučeniny vznikají v biosyntetické cestě kyseliny šikimové (Obr. 9). L-fenylalanin je přímým prekurzorem kyseliny skořicové a enzymem zodpovědným za konverzi je fenylalaninamoniaklyáza. Při této reakci dochází k stereospecifické eliminaci amoniaku a vzniká kyselina *trans*-skořicová (114). Hydroxylaci kyseliny *trans*-skořicové na kyselinu p-kumarovou (4-hydroxyskořicovou) katalyzuje enzym *trans*-cinnamoyl-4-monooxygenáza, cytochrom P-450-dependentní monooxygenáza. Tady se opět biosyntetická cesta větví a může pokračovat až k ligninu. Další klíčovou roli sehrává enzym 4-kumaroyl-CoA-ligáza, který z kyseliny p-kumarové společně s ATP a CoA vytváří 4-kumaroyl-CoA. V další fázi reagují 3 molekuly malonyl-CoA s p-kumaroyl-CoA za spolupůsobení chalkonsyntázy a vzniká chalkon (Obr. 10).

Chalkony v roztoku samovolně cyklizují na příslušné flavanony. V rostlinném organismu je tento krok řízen enzymem chalkonisomerázou a ze žlutě zbarveného 4,2',4',6'-tetrahydroxychalkonu vzniká stereospecifickou izomerací bezbarvý flavanon - naringenin. V tomto stupni syntézy dochází k celé řadě dalších enzymaticky řízených kroků. Působením bližší nespecifikovaných oxidoreduktáz vznikají flavony, např. apigenin nebo různě hydroxylované flavanony. Z naringeninu působením enzymu isoflavonsyntázy vychází biosyntéza isoflavonoidů. Od naringeninu je odvozena syntéza dihydrokempferolu působením enzymu naringenin-3-dioxygenáza. Z dihydroxykempferolu pokračuje biosyntetická cesta dále k *cis*-flavan-3,4-diolu. V této cestě hrají roli dva důležité enzymy dihydroflavonol-4-reduktáza, produktem je *cis*-3,4-leukopelargonidin a další oxidoreduktázou se dostáváme až k anthokyanidinům, vzniká cihlově červený pelargonidin. Z dihydromyricetinu se odvozuje modrý delfinidin a červený cyanidin, který je odvozen z dihydrokvercetinu (114).



Obr. 9: Biosyntéza flavonoidů – šikimátová cesta



Obr. 10: Biosyntéza flavonoidů

3.7.2. ANTIOXIDAČNÍ VLASTNOSTI FENOLICKÝCH LÁTEK

Fenolické látky působí jako antioxidanty různými mechanismy. Fenolické hydroxylové skupiny jsou výbornými donory vodíku: mohou tak reagovat s reaktivními formami kyslíku a dusíku (41,42,56,116-117) v terminační fázi radikálové reakce, což zastavuje cyklus radikálových reakcí. Po reakci s původním reaktivním radikálem se antioxidant sám stává radikálem, má ale vyšší chemickou stabilitu než ten původní. Hydroxylová skupina fenolů reaguje s π elektrony benzenového kruhu a vzniklý radikál je stabilizovaný delokalizací. Tvorbou těchto relativně dlouho žijících radikálů jsou fenolické látky schopné redukovat radikálově způsobené oxidační procesy (86).

Antioxidační aktivita fenolických látek je také dána jejich schopností chelatovat ionty kovů, které se účastní procesu tvorby radikálů (86).

Fenolické látky také mohou reagovat s proteiny, díky přítomnosti hydrofóbních benzenových jader a fenolických hydroxylových skupin, které mají schopnost tvořit vodíkové můstky. Antioxidačně pak mohou působit inhibicí enzymů zahrnutých do procesu tvorby radikálů, jako jsou různé izoformy cytochromu P450, lipooxygenázy, cyklooxygenázy a xantinoxidázy (118).

Také byly popsány synergické účinky fenolů s dalšími antioxidanty, jmenovitě kyselinou askorbovou, β -karotenem a α -tokoferolem (119) a ovlivnění regulace intracelulárních hladin glutathionu (120).

Antioxidační aktivita fenolických látek je závislá na jejich distribuci mezi lipofilní a hydrofilní prostředí. Reakce látky s biomembránou a její adsorbce na membrány je silně závislá na její lipofilitě, která je vyjadřována distribuční konstantou. Vyšší distribuční konstanta umožňuje lepší interakci s membránami, ale může vést ke snížení antioxidačního účinku oproti ve vodě rozpustným oxidantům, jako jsou Fe^{2+} nebo Cu^+ nebo volným radikálům přítomným ve vodném médiu (119).

Fenolické látky jsou schopné vázat proteiny a tato jejich schopnost může také ovlivnit jejich antioxidační aktivitu. Arts a kol. (121) pozorovali nižší antioxidační aktivitu flavonoidů v přítomnosti proteinů. Fenolické látky tedy nedosahují své optimální zhašecí aktivity v matici obsahující proteiny.

Fenolické kyseliny (deriváty kyseliny benzoové a skořicové) představují přibližně jednu třetinu fenolických látek v naší stravě. Typickou skořicovou kyselinou je kyselina kávová, která se vyskytuje v ovoci, zelenině a kávě a je často esterifikovaná kyselinou chinovou (kyselina chlorogenová nebo kyselina 5-kaffeoylchinová) (86). Antioxidační aktivita fenolických kyselin je závislá na počtu a postavení hydroxylových skupin v molekule. Antioxidační schopnosti monofenolů jsou značně zvýšeny přítomností druhé hydroxylové skupiny v *orto* či *para* poloze, také jedna či dvě metoxy skupiny v poloze *orto* vůči hydroxylové skupině zvyšují antioxidační potenciál (86,105).

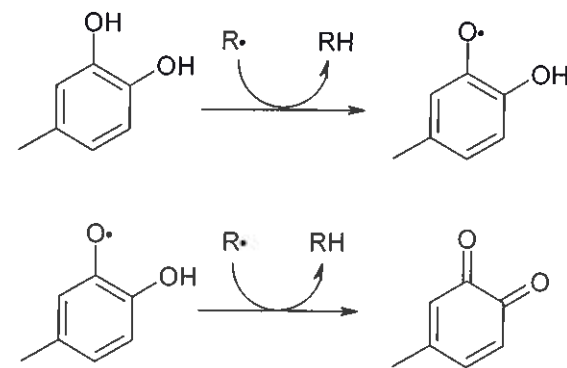
Deriváty skořicové kyseliny vykazují vyšší antioxidační kapacitu než jejich analogy odvozené od kyseliny benzoové. Je to dáno přítomností propenového řetězce namísto karboxylové skupiny u derivátů kyseliny benzoové: elektrony poutající karboxylová funkční skupina má u hydroxylovaných benzoátů negativní vliv na schopnost darovat

vodíkový proton (86). Konjugovaná dvojná vazba ve vedlejším řetězci skořicových kyselin zřejmě rezonancí stabilizuje vzniklý fenoxylový radikál, čímž zvyšuje antioxidační aktivitu aromatického kruhu (86). Substituce funkčními skupinami, které mohou poskytovat elektron (alkyl či metoxy- skupinami) v poloze *orto*, dochází ke zvýšení stability vzniklého aryloxylového radikálu, který se tvoří po odevzdání vodíku hydroxylovou funkční skupinou (86).

Flavonoidy jsou největší skupinou sekundárních rostlinných fenolů a zahrnují širokou skupinu v přírodě se vyskytujících látek. Mohou se nacházet ve všech částech rostliny. Jsou důležitou složkou lidské stravy. Příjem flavonoidů se může pohybovat od 50 do 800 mg za den, v závislosti na spotřebě ovoce a zeleniny a určitých nápojů, jako je červené víno, čaj či nefiltrované pivo. Dalšími nezanedbatelnými zdroji flavonoidů jsou léčivé rostliny a příslušná fytofarmaka (122). Flavonoidy jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem. Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo metoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší stupněm substituce a oxidace. Rozeznáváme následující základní struktury flavonoidů: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavononoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny. Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů, obsahují tedy ve své molekule necukernou součást (aglykon) a cukernou složku. Volné aglykony se vyskytují pouze zřídka. V některých případech (při technologickém zpracování za vyšších teplot a v kyselém prostředí) může docházet k hydrolyze glykosidů a vzrůstu koncentrace aglykonů. Flavonoly jsou nejhojnější skupinou flavonoidů zastoupených v ovoci a zelenině, kvercetin a kempferol jsou jejich nejběžnější zástupci. Hlavní flavan-3-oly jsou katechiny, které jsou nejrozšířenějšími látkami v čaji (123). Kvercetin je hlavním flavonolem v lidské stravě a je zvláště hojný v cibuli (86). Hlavním zdrojem flavanonů jsou citrusové plody (86). Jediným významnějším zdrojem isoflavonů je sója. Isoflavony mají estrogení účinky a proto jsou nazývány také rostlinné fytoestrogeny. Méně početnou skupinu flavonoidů tvoří flavony, které se nacházejí například ve sladké červené paprice a v celeru. Antokyany jsou rostlinná barviva a nacházejí se v modrých a červených plodech (86).

Antioxidační aktivita flavonoidů závisí na počtu a uspořádání funkčních skupin na aromatickém jádře. Lze říci, že prostorová orientace substituentů má na antioxidační

aktivitu větší vliv než samotná struktura flavonoidu (86). Uspořádání hydroxylových skupin na kruhu B je určujícím faktorem pro zhášecí aktivitu vůči reaktivním formám kyslíku i dusíku. Hydroxyskupiny v poloze 3' a 4' kruhu B zvyšují antioxidační aktivitu (86). Oxidací dochází ke vzniku *ortho*-semichinonového radikálu relativně stálého díky schopnosti elektronové delokalizace. Ten může dále reagovat s dalším radikálem za vzniku chinonu (Obr. 11) (86,122).



Obr. 11: Zhášení radikálu flavonoidy

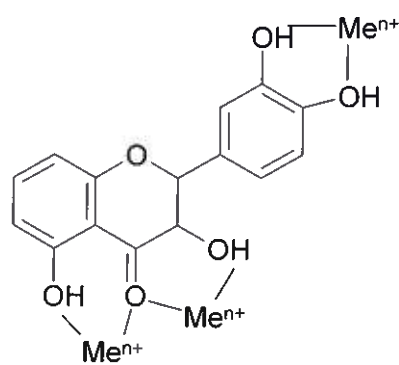
Zhášecí aktivita flavonoidů je také závislá na volné 3-hydroxylové skupině, která napomáhá lepší stabilitě flavonoidního radikálu (124). Flavony a flavonoly obsahující katecholové seskupení na kruhu B jsou vysoce aktivní, přičemž flavonoly jsou ve srovnání s odpovídajícími flavony lepšími antioxidanty díky přítomnosti 3-hydroxy skupiny (122). Zhášecí schopnosti také silně ovlivňuje prostorová orientace kruhu B vzhledem ke zbytku molekuly: flavonoly a flavanoly s 3-OH skupinou jsou planární, zatímco flavony a flavanony bez přítomnosti této funkční skupiny jsou lehce stočené. Planarita umožňuje konjugaci, elektronovou dislokaci a zvyšuje stabilitu flavonoidního fenoxylového radikálu, odnětím OH skupiny v poloze 3 dochází ke snížení antioxidační aktivity (116). Také 5-OH skupina může přispívat k antioxidační aktivitě a to tak, že zvyšuje rezonanci molekuly v přítomnosti 2,3-dvojně vazby a 3-OH a 4-*oxo* skupin (116,86).

Co se týče izoflavonů, umístění kruhu B v pozici 3 heterocyklického kruhu silně mění antioxidační aktivitu. Pro antioxidační aktivitu je zde nutná OH skupina v poloze 4', přičemž její metylaci dochází ke značnému poklesu účinku (122).

Rozdíly v antioxidační aktivitě polyhydroxylovaných a polymetoxylovaných flavonoidů zřejmě vycházejí z rozdílů v jejich lipofilitě a prostorovém uspořádání. Ačkoliv z poměru metoxy skupin oproti hydroxy skupinám nemůžeme jednoznačně odvodit rozdíly ve zhášecí schopnosti flavonoidu, postavení metoxy skupin zvláště na kruhu B může podstatně ovlivnit aktivitu. Sterickým blokováním 3',4'-katecholové struktury metylací 4'-OH skupiny dochází ke značnému úbytku antioxidačních schopností. Také vícečetná metoxylace kruhu A ruší pozitivní efekt katecholové struktury kruhu B (116). Pro elektronovou delokalizaci kruhu B a tedy i antioxidační aktivitu je výhodná přítomnost 2,3-dvojně vazby v konjugaci s 4-*keto* skupinou (86). Jak se zdá, 2,3-dvojně vazba má, bez přítomnosti difenolické struktury kruhu B, pouze malý vliv na schopnost molekuly darovat vodík. Optimální pro antioxidační aktivitu flavonoidu je dvojně vazba 2,3 v kombinaci s 4-*keto* skupinou a 3-hydroxy skupinou a v přítomnosti *o*-dihydroxy seskupení kruhu B.

Glykosylované flavonoidy mají oproti odpovídajícím aglykonům nižší antioxidační aktivitu (86,124). Glykosylaci dochází jednak k blokování hydroxylových skupin nezbytných pro odnětí vodíku a zhášecí aktivitu, kterákoliv molekula cukru také způsobí narušení planarity kruhu B vzhledem k celé molekule flavonoidu a tak ztrátu schopnosti delokalizovat elektrony. Zavedením cukru do molekuly také dochází ke zvýšení hydrofility molekuly, což mění schopnosti antioxidantu prostupovat do lipofilní fáze (116).

Jak již bylo řečeno, flavonoidy působí antioxidačně také díky jejich schopnosti chelátovat ionty. Pro chelataci iontů jsou v molekule flavonoidu důležitá tato místa: katecholová 3',4'-dihydroxy skupina kruhu B a substituce 4-*keto*, 3-hydroxy či 4-*keto*, 5-hydroxy kruhu C u flavonolů (86,122) (Obr. 12).



Obr. 12: Místa vazby flavonoidů s kovy

4. MATERIÁL A METODY

4.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

- 1,1- diphenyl – 2-picrylhydrazyl: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 5-methylfenazinium-methyl-sulfát: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 β-nikotinamid adenin dinukleotid: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 Acetonitril: Merck (Darmstadt, Německo)
 Chlorid železnatý, bezvodý: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 Deoxyribóza: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 Kyselina etylendiamintetraoctová: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 Chlornan sodný se 4% dostupného chlornanu: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 Kyselina askorbová: Sigma (St. Louis, MO, USA),
 Kyselina mravenčí: Merck (Darmstadt, Německo)
 Kyselina octová: Merck (Darmstadt, Německo)
 Kyselina sírová: Pronalab (Lisabon, Portugalsko)
 Kyselina thiobarbiturová: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 Kyselina trichloroctová: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 Kyselina trifluoroctová: Merck (Darmstadt, Německo)
 Metanol: Merck (Darmstadt, Německo)
 N-(1-naftyl)-etylendiamin dihydrochlorid: Merck (Darmstadt, Německo)
 Nitroprusid sodný dihydrát: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 Nitrotetrazolinová modř: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 Octan amonný: Merck (Darmstadt, Německo)
 Sulfanilamid: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 Xantin: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 Xantinoxidáza I (EC 1.1.3.22): Sigma (St. Louis, MO, USA)
- Standardy*
- Kyselina akonitová: Extrasynthése (Genay, Francie)
 Kyselina citrónová: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 Kyselina fumarová: Sigma (St. Louis, MO, USA)
 Kyselina chinová: Sigma (St. Louis, MO, USA)

Kyselina chlorogenová: Extrasynthese (Genay, Francie)
Kyselina jablečná: Sigma (St. Louis, MO, USA)
Kyselina kafeoyljablečná: PhytoLab (Hamburk, Německo)
Kyselina kávová: Extrasynthese (Genay, Francie)
Kempferol 3- O-rutinosid: Extrasynthese (Genay, Francie)
Kempferol 3- O-glukosid: Extrasynthese (Genay, Francie)
Kyselina ketoglutarová: Sigma (St. Louis, MO, USA)
Linarin: Extrasynthese (Genay, Francie)
Kyselina šťavelová: Sigma (St. Louis, MO, USA)
Kyselina šikimová: Sigma (St. Louis, MO, USA)
Verbaskosid: PhytoLab (Hamburk, Německo)

Voda byla čištěna systémem: Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

4.2. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Analytické váhy KERN (Německo)
Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex (Německo)
Vodní lázeň KL, Laboratorní přístroje (Praha)
Mikrostříkačka Hamilton (Švýcarsko)
Detektor DAD Gilson (Francie)
Detektor UV Gilson (Francie)
Kolona Spherisorb ODS2 reversed-phase (Waters, Milford, USA) (velikost částic 250 x 4.6 mm, 5 µm)
Kolona iontově výměnná Nucleogel® Ion 300 OA (Waters, Milford, USA) (velikost částic 300 x 7.7 mm)
Chromatograf Gilson (Francie)
Spektrofotometr - snímač mikrotitračních desek: ELX808 IU Ultra Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Inc) Winooski, Vermont 05404-0998 USA
Dvoupaprskový spektrofotometr Heλios α (Unicam, Velká Británie)
Lyofilizátor Labconco 4.5 (Kansas City, MO)
Destilační přístroj: Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA)

Kolony pro SPE: **ISOLUTE C18** non-end-capped (NEC) SPE kolony (50 µm velikost částic, 60 Å pórovitost; 0.5 g hmotnost sorbentu/6 ml objem zásobníku, International Sorbent Technology Ltd. (Mid Glamorgan, Velká Británie).

Chromabond (45 µm velikost částic; 0.5 g hmotnost sorbetu/6 ml objem zásobníku)

4.3. ROSTLINNÝ MATERIÁL

4.3.1. Ballota nigra (Lamiaceae)

Botanická zahrada léčivých rostlin, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovi Hradec Králové, Česká Republika.

4.3.2. Linaria vulgaris L. (Scrophulariaceae)

Natura a.s., Děčín, Česká Republika.

4.3.3. Brassica oleracea L. var. costata DC. (Brassicaceae) („trouchuda“ zelí)

Zevní listy:

Studovány byly vzorky zelí pěstovaného za různých agronomických podmínek ve Valbomu dos Figos, region Mirandela, na severovýchodě Portugalska. Setba proběhla v červnu 2002 a sazenice byly přesazeny na pole ke konci srpna. Na jednom z polí bylo využito pouze organické hnojení podle ustanovení státního agronomického úřadu (Instituto de Desenvolvimento Rural e Hidráulica) a směrnic o organické produkci (EEC 2092/91 -24. června, 1991). Organické pole bylo hnojeno pouze ovčí mrvou, žádné další ošetření nebylo provedeno. Na druhém poli bylo zelí pěstováno tradičním způsobem, kde se kromě ovčí mrvy hnojilo minerálně: 20,5 % dusičnanu amonného a 21,8 % CaO (Nitrolusal 20,5 %) v množství 50 kg/ha. Na tomto poli bylo také koncem září zelí ošetřeno deltamethrinem (Decis) (Bayer Crop Science) v koncentraci 30 ml/hL. Po sklizni ve 2 různých obdobích byly vzorky zelí ihned převezeny do laboratoře, kde se oddělily zevní a vnitřní listy. Skladovány byly v mrazicím boxu při -20°C. Podmínky pěstování a dobu sběru uvádí Tab. 3.

Tab. 3: Charakteristika vzorků "tronchuda" zelí

Vzorky	Datum sběru	Typ kultivace
A	listopad 2002	organická
B	listopad 2002	tradiční
C	prosinec 2002	organická
D	prosinec 2002	tradiční

Vnitřní listy:

Pro analýzu vnitřních listů byly použity vzorky zelí sbíraného v říjnu 2004 a pěstovaného organicky, podle ustanovení státního agronomického úřadu (Instituto de Desenvolvimento Rural e Hidráulica) a směrnic o organické produkci (EEC 2092/91 - 24. června, 1991). Po sklizni byly vzorky zelí ihned převezeny do laboratoře, kde se oddělily zevní a vnitřní listy. Vnitřní listy byly zmrazeny, lyofilizovány (Modulyo 4K Freeze Dryer Ed wards), lyofilizovaný materiál byl rozetřen na prášek a uchováván v exsikátoru, ve tmě. Stejným způsobem byly zpracovány i zevní listy.

4.4. PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO HPLC ANALÝZU A HODNOCENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

4.4.1. Ballota nigra

Nadzemní části *Ballota nigra* byly sbírány v září 2005, usušeny při pokojové teplotě, poté rozmělněny (síto 355) a smíchány. Droga vyhovovala článku *Ballotae nigrae herba* ČL 2002 (125). Nálev byl připraven zalitím 5 g drogy 500 ml vroucí destilované vody. Po 15ti minutách stání byl zfiltrován přes Büchnerovu nálevku a poté lyofilizován. Lyofilizát byl skladován v exsikátoru, ve tmě.

4.4.2. Linaria vulgaris

Nálev byl připraven zalitím 5 g drogy 500 ml vroucí destilované vody. Po 15ti minutách stání byl zfiltrován přes Büchnerovu nálevku a poté lyofilizován. Lyofilizát byl skladován v exsikátoru, ve tmě.

4.4.3. Brassica oleracea L. var. costata DC.

1) Zevní listy:

Vzorky pro analýzu byly vybrány po předchozí analýze dle obsahu fenolických látek (126). Extrakt ze zevních listů byl připraven vařením 30 g zevních listů v 600 ml vody

po dobu 1 hodiny a poté zfiltrováním přes Büchnerovu nálevku. Získaný extrakt byl lyofilizován. Lyofilizát byl skladován v exsikátoru, ve tmě.

2) Vnitřní listy:

a) pro identifikaci fenolických látek byl lyofilizovaný rostlinný materiál (cca 0,5 g) smíchán s 5 ml směsí voda:metanol (1:1), ultrasonifikován, centrifugován a zfiltrován.

b) pro kvantifikaci fenolických látek a zkoušky na antioxidační aktivitu byl extrakt připraven vařením 3,0 g lyofilizovaných listů v 600 ml vody po dobu 1 hodiny. Získaný extrakt byl poté zfiltrován přes Büchnerovu nálevku a lyofilizován. Lyofilizát byl skladován v exsikátoru, ve tmě.

4.5. HPLC ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK

Parametry vysokoúčinné kapalinové chromatografie použité v této práci byly pokusně sestaveny v laboratoři farmakognozie Farmaceutické fakulty Univerzity Porto. Všechny metody byly validovány a na základě sledovaných validačních parametrů byla prokázána spolehlivost metod při opakovaném použití v laboratoři.

K usnadnění identifikace a kvantifikace látek byla použita metoda vnějšího standardu nebo byly látky identifikovány a kvantifikovány na základě předchozí HPLC-DAD-MS/MS-ESI analýzy.

Zjištěná data byla zpracovávána Unipoint software systémem (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, Francie). Čistota píku byla kontrolována příslušenstvím softwaru.

4.5.1. HPLC ANALÝZA

4.5.1.1. Ballota nigra

HPLC analýza byla provedena postupem popsáním v práci autorů Silva et al. (127).

Podmínky HPLC:

Chromatograf: Gilson

Kolona: Spherisorb ODS2 RP kolony (Waters, Milford, USA; 250×4,6 mm, 5 μm velikost částic)

Objem nástřiku: 20 μ l.

Mobilní fáze: směs kyseliny mravenčí 5 % (A) a metanolu (B)

Eluční profil: gradientová eluce: 0 min - 5% B, 3 min - 15% B, 13 min - 25% B, 25 min - 30% B, 35 min - 35% B, 39 min - 45% B, 44 min - 50% B

Rychlost průtoku: 0,9 ml.min⁻¹

Detekce: Gilson DAD detektor, 200-400 nm, chromatogramy byly zaznamenávány při 320 nm

Standardy: verbaskosid, kaffeoyljablečná, chlorogenová a kávová kyselina

Analyzovaný vzorek: Přesně odvážené množství lyofilizátu bylo rozpuštěno v 1 ml superčisté vody a zfiltrováno (membránový filtr 0,45 μ m)

Získaný chromatogram je uveden na Obr. 13 v části výsledky a diskuze. Verbaskosid, kaffeoyljablečná, chlorogenová a kávová kyselina byly identifikovány na základě jejich chromatografického chování, srovnáním retenčních časů a UV-VIS spekter v rozmezí 200-400 nm se standardy. Další fenylpropany byly identifikovány na základě již publikovaných dat (128,129): dodržáním shodných experimentálních podmínek jako v práci Kirmizibekmez et al. (129) se podařilo získat chromatogram, kde verbaskosid, forsythosid B a alyssonosid měly stejné pořadí eluce a UV spektra. Ballotetrosid byl identifikován na základě charakteristického tvaru a absorpčního maxima jeho UV spektra (128). Fenolické látky byly kvantifikovány metodou externího standardu. Obsah chlorogenové, kávové, kaffeoyljablečné kyseliny a verbaskosidu byl kvantifikován porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí jejich externě měřených standardů, ostatní látky byly kvantifikovány jako verbaskosid. Výsledky uvádí Tab. 4 v části výsledky a diskuze.

4.5.2.2. *Linaria vulgaris*

HPLC analýza byla provedena postupem popsáním v práci autorů Silva et al. (127) s modifikovanou rychlostí průtoku mobilní fáze (1 ml.min⁻¹).

Podmínky HPLC:

Chromatograf: Gilson

Kolona: Spherisorb ODS2 RP kolony (Waters, Milford, USA; 250×4,6 mm, 5 μ m velikost částic)

Objem nástřiku: 20 μ l.

Mobilní fáze: směs kyseliny mravenčí 5 % (A) a metanolu (B)

Eluční profil: gradientová eluce: 0 min - 50% B, 20 min - 60% B, 35 min - 60% B.

Rychlost průtoku: 1 ml.min⁻¹

Detekce: Gilson DAD detektor, 200-400 nm, chromatogramy byly zaznamenávány při 320 nm

Standardy: linarin

Linarin byl identifikován srovnáním retenčního času a UV-VIS spektra v rozmezí 200-400 nm se standardem. Fenolické látky byly kvantifikovány metodou externího standardu dle absorbance zaznamenávané při 320 nm. Všechny detekované látky byly kvantifikovány jako linarin. Výsledky uvádí Obr. 19 a Tab. 7 v části výsledky a diskuze.

4.5.2.3. *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC.

Vnější listy, vnitřní listy

HPLC analýza byla provedena postupem popsáním v práci autorů Ferreres et al. (126). Identifikace fenolických látek proběhla na základě předchozí HPLC-DAD-MS/MS-ESI analýzy (126,130).

Podmínky HPLC:

Chromatograf: Gilson

Kolona: Spherisorb ODS2 RP kolony (Waters, Milford, USA; 250×4,6 mm, 5 μ m velikost částic)

Objem nástřiku: 20 μ l.

Mobilní fáze: směs kyseliny mravenčí 5 % (A) a metanolu (B)

Eluční profil: gradientová eluce: 0 min - 10% B, 25 min - 20% B, 40 min - 50% B, 45 min - 50% B, 46 min - 90% B, 50 min - 90% B, 55 min - 100% B, 58 min - 100% B, 60 min - 10% B.

Rychlost průtoku: 1 ml.min⁻¹

Detekce: Gilson DAD detektor, 200-400 nm, chromatogramy byly zaznamenávány při 330 nm

Standardy: kempferol 3-O-rutinosid, rutin, kyselina *p*-kumarová, kyselina sinapová

Zevní listy:

Fenolické látky byly kvantifikovány metodou externího standardu. S výjimkou kempferol 3-*O*-glukosidu byly identifikované látky kvantifikovány jako kempferol 3-*O*-rutinosid, neboť žádná z nich nebyla dostupná na trhu. Výsledky ukazuje Obr. 26 a Tab. 10 a 14 v části výsledky a diskuze.

Vnitřní listy:

Fenolické látky byly kvantifikovány metodou externího standardu. Protože standardy látek identifikovaných ve vnitřních listech zelí nebyly dostupné na trhu, kvercetin 3-*O*-soforosid-7-*O*-glukosid byl kvantifikován jako rutin, 3- a 4-*p*-kumaroylchinové kyseliny jako kyselina *p*-kumarová a deriváty kempferolu jako kempferol 3-*O*-rutinosid a deriváty kyseliny sinapové jako kyselina sinapová. Výsledky ukazuje Obr. 35 a Tab. 13 v části výsledky a diskuze.

4.6. HPLC ANALÝZA ORGANICKÝCH KYSELIN

4.6.1. PŘÍPRAVA VZORKŮ

4.6.1.1. *Ballota nigra*

1 mg lyofilizovaného vzorku byl rozpuštěn ve vodě o pH 2 (s HCl) a roztok byl podroben extrakci na pevné fázi s využitím kolony ISOLUTE C18 (NEC) (50 µm velikost částic, 60 Å pórovitost; 0.5 g hmotnost sorbentu/6 ml objem zásobníku), která byla nejprve aktivována 2 ml metanolu a 5 ml kyselé vody (pH 2, okyseleno HCl). Zachycený vodný extrakt obsahující organické látky spolu s dalšími polárními látkami byl odpařen do sucha na vakuové odparce (40°C), znovu rozpuštěn v 5 mM kyselině sírové (1 ml) a 20 µl bylo analyzováno za použití HPLC/UV. Roztok standardů byl připraven rozpuštěním v 5 mM kyselině sírové.

4.6.1.2. *Linaria vulgaris*

36 mg lyofilizovaného vzorku bylo rozpuštěno ve vodě o pH 2 (s HCl) a roztok byl podroben SP extrakci na C18 koloně (Chromabond) (45 µm velikost částic; 0.5 g hmotnost sorbetu/6 ml), která byla nejprve aktivována 2 ml metanolu a 5 ml kyselé vody (pH 2 s HCl).

Zachycený vodný extrakt obsahující organické látky spolu s dalšími polárními látkami byl odpařen do sucha na vakuové odparce (40°C), znovu rozpuštěn v 5 mM kyselině sírové (1 ml) a 20 µl bylo analyzováno za použití HPLC/UV. Roztok standardů byl připraven rozpuštěním v 5 mM kyselině sírové.

4.6.1.3. *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC.

Zevní listy, vnitřní listy:

Přesně odvážené množství lyofilizátu bylo rozpuštěno v 5 mM kyselině sírové (1 ml) a 20 µl bylo analyzováno za použití HPLC/UV. Roztok standardů byl připraven rozpuštěním v 5 mM kyselině sírové.

4.6.2. HPLC ANALÝZA

4.6.2.1. *Ballota nigra*, *Linaria vulgaris*

Separace byla provedena postupem popsaným v práci autorů Ferreres et al. (130). Podmínky HPLC analýzy byly shodné s podmínkami analýzy *Brassica oleracea* (viz níže) s modifikací rychlosti průtoku (0,2 ml.min⁻¹). HPLC chromatogram organických kyselin je znázorněn na Obr. 15 a 21 a zjištěný obsah ukazují Tab. 5 a 8.

4.6.2.2. *Brassica oleracea* L. var. *costata* DC.

Zevní listy, vnitřní listy:

HPLC separace byla provedena postupem popsaným v práci autorů Silva et al. (131). Kvantifikace organických kyselin byla provedena metodou vnějšího standardu.

Chromatograf: Gilson

Kolona: Nucleogel® Ion 300 OA (300 × 7.7 mm) ve spojení s topnou jednotkou (30°C)

Objem nástřiku: 20 µl.

Mobilní fáze: kyselina sírová 5 mM

Eluční profil: isokratická eluce

Rychlost průtoku: 0,1 ml.min⁻¹; 0,2 ml.min⁻¹ pro vnitřní listy

Detekce: UV Gilson; λ = 214 nm

Standardy: askorbová, citrónová, jablečná, šikimová, fumarová, šťavelová, chinová, akonitová, ketoglutarová kyselina

4.7. ZHÁŠENÍ DPPH

Antiradikálová aktivita extraktů byla zjišťována spektrofotometricky s využitím snímače mikrotitračních desek ELX808 IU Ultra Microplate Readeru (Bio-Tek Instruments, Inc), sledováním redukce DPPH[•] při 515 nm, postupem popsaným v práci Silva et al. (132). Pro každý extrakt bylo připraveno 5 různých koncentrací vzorku.

Do jednotlivých cel na mikrotitrační desce pro 96 cel se postupně přidávalo:

1. 25 µl roztoku vzorku v různých koncentracích, rozpuštěného v metanolu p.a. (resp. v destilované vodě)
2. 200 µl roztoku DPPH[•] v koncentraci 150 µM (Roztok se připravil rozpuštěním 591,45 µg DPPH[•] v 10,0 ml metanolu p.a.)

Pro každou koncentraci byla měření provedena třikrát. Reakce byla iniciována přidáním roztoku DPPH[•] a po uplynutí doby nutné k totální reakci vzorku a DPPH[•] (30 minut) bylo provedeno měření. Současně byl změřen také kontrolní roztok a porovnávací roztok pro vzorek i kontrolu. Porovnávací vzorek pro vzorek tvořilo 25 µl roztoku vzorku v různých koncentracích a 200 µl metanolu, pro kontrolu pouze metanol. Kontrolní vzorek byl připraven smícháním 25 µl metanolu (resp. vody) a 200 µl roztoku DPPH[•].

„Zhášecí“ aktivita byla vypočítána podle vztahu:

$$\% \text{ redukce DPPH} = (1 - A_v / A_k) \cdot 100,$$

kde A_v = absorbance testovaného vzorku v čase $t = 30$ minut

A_k = absorbance kontrolního vzorku v čase $t = 30$ minut

Aktivita vzorku byla vyjádřena v hodnotě IC_{25} , popř. IC_{50} , která značí koncentraci testovaného vzorku schopnou redukce 25, popř. 50 % radikálu. Tato hodnota byla odečtena z grafu závislosti % redukce na koncentraci. Pokud naměřené hodnoty nedovolovaly odečíst hodnotu IC_{50} , aktivita byla vyjádřena v IC_{25} .

Výsledky měření jsou znázorněny na Obr. 16, 22, 29, 38 a Tab. 12 v části výsledky a diskuze.

4.8. ZHÁŠENÍ SUPEROXIDOVÉHO RADIKÁLU

4.8.1. SUPEROXID GENEROVANÝ NEENZYMATICKY

Superoxidový radikál byl generován reakcí 5-methylfenazinium-methyl-sulfátu (PMS) a nikotinamidudinukleotidu (NADH) podle postupu popsaném v práci Valentão et al. (12). Stanovení byla prováděna třikrát pro každou koncentraci i pro kontrolní vzorek s využitím snímače mikrotitračních desek ELX808 IU Ultra Microplate Readeru (Bio-Tek Instruments, Inc), při vlnové délce 560 nm.

Příprava činidel: Veškerá činidla byla připravována a používána v den měření.

NADH 166 µM: 35 mg NADH bylo rozpuštěno v 50,0 ml pufru (KH_2PO_4 19mM, pH 7,4). Připravený roztok byl uchovávan v ledu.

NBT 43 µM: 3,3 mg NBT bylo rozpuštěno v 50,0 ml pufru (KH_2PO_4 19mM, pH 7,4). Roztok byl po dobu měření chráněn před světlem.

PMS 2,7 µM: 1 mg PMS byl rozpuštěn v 1 ml pufru (KH_2PO_4 19mM, pH 7,4). Z roztoku bylo odebráno 250 µl a doplněno do 50,0 ml pufru. Roztok byl po dobu měření chráněn před světlem.

Puf: KH_2PO_4 19mM, pH 7,4. 2,6g KH_2PO_4 bylo rozpuštěno v 1000,0 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena na potenciometru s využitím 0,1 mM roztoku hydroxidu draselného.

Postup měření a výpočty:

Do jednotlivých cel na mikrotitrační desce pro 96 cel se postupně přidávalo:

1. 50 µl roztoku vzorku, rozpuštěného ve fosfátovém pufru KH_2PO_4 o koncentraci 19 mM a pH 7,4
2. 50 µl roztoku NADH 166 µM
3. 150 µl roztoku NBT 43 µM
4. 50 µl roztoku PMS 2,7 µM

Reakce byla iniciována přidáním roztoku PMS. Měření probíhalo po dobu 2 minut, při nastavení spektrofotometru na kinetickou funkci, při pokojové teplotě. Současně byl měřen také kontrolní roztok a porovnávací roztok pro vzorek i kontrolu.

Inhibice redukce NBT byla vypočítána ze vzorce:

$$\% \text{ inhibice redukce NBT} = (1 - A_v / A_k) \cdot 100,$$

kde A_v = nárůst absorbance testovaného vzorku v čase $t = 2$ min

A_k = nárůst absorbance kontrolního vzorku v čase $t = 2$ min

Aktivita byla vyjádřena v hodnotě IC_{25} , popř. IC_{50} , která byla odečtena z grafu závislosti % inhibice redukce NBT na koncentraci. Výsledky měření aktivity vzorků oproti superoxidovému radikálu produkovaném neenzymaticky jsou znázorněny na Obr. 17, 23, 30A, 39 a v Tab. 12. v části výsledky a diskuze.

4.8.2. SUPEROXID GENEROVANÝ ENZYMATICKY

Stanovení byla prováděna třikrát pro každou koncentraci i pro kontrolní vzorek s využitím snímače mikrotitračních desek ELX808 IU Ultra Microplate Readeru (Bio-Tek Instruments, Inc), při vlnové délce 560 nm.

Příprava činidel: Veškerá činidla byla připravována a používána v den měření.

Roztok A byl připraven spojením 5 ml roztoku xantinu s 50 ml roztoku NBT. Roztok byl po dobu měření chráněn před světlem. Xantin byl připraven rozpuštěním 0,55 mg xantinu (44 μ M) v 5,0 ml NaOH o koncentraci 1 μ M při teplotě 60°C na ultrazvukové lázni a roztok NBT rozpuštěním 3,4 mg NBT (50 μ M) v 50,0 ml fosfátového pufru (viz níže).

Roztok B - roztok *in situ* xantinoxidázy 0,29 U/ml. 60 μ l xantinoxidázy bylo převedeno do kalibrované zkumavky na 10,0 ml a doplněno do 10,0 ml EDTA 0,1 mM. Roztok se po dobu měření uchovával v ledu.

Pufr - $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 50mM s EDTA 0,1 mM, pH 7,8.

8,9 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ a 0,0372 g EDTA bylo rozpuštěno v 1000,0 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena na potenciometru s využitím 0,1 mM roztoku hydroxidu draselného.

Postup měření a výpočty:

Do jednotlivých cel na mikrotitrační desce pro 96 cel se postupně přidávalo:

1. 50 μ l roztoku vzorku, rozpuštěného ve fosfátovém pufru $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ o koncentraci 50mM s EDTA 0,1 mM, pH 7,8
2. 200 μ l roztoku A
3. 50 μ l roztoku B

Reakce byla iniciována přidáním roztoku xantinoxidázy do směsi. Měření probíhalo po dobu 2 minut, při nastavení spektrofotometru na kinetickou funkci, při pokojové teplotě. Současně byl měřen také kontrolní roztok a porovnávací roztok pro vzorek i kontrolu.

Z naměřených hodnot byla vypočítána inhibice redukce NBT (vzorec viz neenzymatická metoda) a z grafu závislosti inhibice redukce na koncentraci odečtena hodnota IC_{25} , popř. IC_{50} . Výsledky měření aktivity vzorků oproti superoxidovému radikálu produkovaném enzymaticky jsou znázorněny na obrázku Obr. 17, 23, 30B, 39 a v Tab. 12 v části výsledky a diskuze.

4.8.2.1 Aktivita vůči xantinoxidáze

Protože vzorek může nejen zhášet superoxidový radikál, ale také může ovlivňovat jeho produkci reakcí s enzymem, byla sledována také jeho aktivita vůči xantinoxidáze. Aktivita vůči xantinoxidáze byla měřena spektrofotometricky sledováním konverze xantinu na kyselinu močovou, která vykazuje maximum při vlnové délce 295 nm.

Příprava činidel:

Roztok A byl připraven spojením 5 ml roztoku xantinu s 50,0 ml fosfátového pufru. Roztok byl po dobu měření chráněn před světlem. Xantin byl připraven rozpuštěním 0,55 mg xantinu (44 μ M) v 5,0 ml NaOH o koncentraci 1 μ M při teplotě 60°C na ultrazvukové lázni.

Roztok B - roztok *in situ* xantinoxidázy 0,29 U/ml.

Pufr - $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 50mM s EDTA 0,1 mM, pH 7,8.

Postup měření a výpočty:

Do květy se postupně přidávalo:

Porovnávací roztok

1. 400 μ l roztoku A
2. 100 μ l roztoku vzorku
3. 100 μ l EDTA 0,1mM

Vzorek

1. 400 μ l roztoku A
2. 100 μ l roztoku vzorku
3. 100 μ l roztoku B

Sledován byl průběh reakce po dobu 2 minut, za pokojové teploty, přičemž reakce byla iniciována přidáním roztoku XO. Měření byla pro každou koncentraci prováděna třikrát. Současně se vzorkem byl změřen také kontrolní roztok, který namísto vzorku obsahoval pufr.

Procenta inhibice účinku XO byla vypočítána dle vztahu:

$$\% \text{ inhibice účinku XO} = (1 - A_v / A_k) \cdot 100,$$

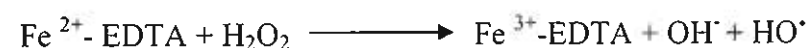
kde A_v = nárůst absorbance testovaného vzorku v čase $t = 2$ min

A_k = nárůst absorbance kontrolního vzorku v čase $t = 2$ min

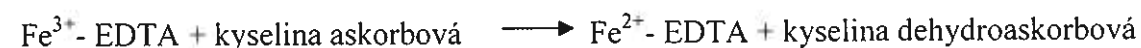
Aktivita byla vyjádřena v hodnotě IC_{25} která byla odečtena z grafu závislosti % inhibice účinku XO na koncentraci. Výsledky měření aktivity vzorků oproti xantinoxidáze jsou znázorněny na Obr. 17, 23, 30C, 39 v části výsledky a diskuze.

4.9. ZHÁŠENÍ HYDROXYLOVÉHO RADIKÁLU

Hydroxylové radikály jsou produkovány reakcí peroxidu vodíku, Fe^{2+} -EDTA a kyseliny askorbové, tzv. Fentonovou reakcí:



Průběh reakce je urychlován přidáním redukčních činidel (kyseliny askorbové), které redukují Fe^{3+} na Fe^{2+} , popř. Cu^{2+} na Cu^+ :



Hydroxylový radikál, produkováný Fentonovou reakcí, je vychytáván deoxyribózou, přičemž se tvoří směs degradačních produktů. Zahřátím směsi v přítomnosti kyseliny vzniká malonyldialdehyd, který je detekován spektrofotometricky po reakci

s thiobarbiturovou kyselinou jako barevný (růžový) produkt s maximem absorpce při 532 nm.

Příprava činidel: Veškerá činidla byla připravována a používána v den měření.

Kyselina askorbová (100 μ M): 17,6 mg se rozpustilo v 10,0 ml fosfátového pufru (viz níže). Roztok se po dobu měření uchovával chráněn před světlem.

$FeCl_3$ (40 μ M): 12,8 mg se rozpustilo ve 100,0 ml EDTA o koncentraci 2 mM. Roztok se uchovával chráněn před světlem.

EDTA $Na_2 \cdot 2H_2O$ (2 mM): 0,744 g EDTA se rozpustilo v 1000,0 ml destilované vody.

H_2O_2 (2,13 mM): 48,3 μ l H_2O_2 se převedlo do kalibrované zkumavky a doplnilo do 10,0 ml fosfátovým pufrem (viz níže)

Deoxyribóza (2,8 mM): 19 mg se rozpustilo v 5,0 ml pufru

Pufr: KH_2PO_4 -KOH 10 mM, pH 7,4. 1,36 g KH_2PO_4 se rozpustilo v 1000,0 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena na potenciometru s využitím 0,1 mM roztoku hydroxidu draselného.

Postup měření a výpočty:

Měření byla prováděna dvakrát, ve dvoupráskovém spektrofotometru nastaveném na funkci fotometrickou při 532 nm.

• Ve zkumavkách se postupně smíchalo:

Porovnávací roztok

1. 780 μ l pufru
2. 10 μ l kyseliny askorbové
3. 50 μ l $FeCl_3$
4. 50 μ l H_2O_2
5. 10 μ l vzorku
6. 100 μ l pufru

Vzorek

1. 780 μ l pufru
2. 10 μ l kyseliny askorbové
3. 50 μ l $FeCl_3$
4. 50 μ l H_2O_2
5. 10 μ l vzorku
6. 100 μ l roztoku deoxyribózy

- Směs se inkubovala na vodní lázni při 37°C po dobu 1 hodiny.
- Poté se přidal 1,0 ml kyseliny trichloroctové 2,8 % a 1,0 ml čerstvě připraveného 1 % roztoku kyseliny thiobarbiturové
- Směs se poté nechala inkubovat na vroucí vodní lázni po dobu 15ti minut
- Po vychladnutí se změřila absorbance při 532 nm.

Z naměřené absorbance bylo vypočítáno procento redukce hydroxylového radikálu podle vztahu:

$$\% \text{ redukce HO}^{\bullet} = (1 - A_v / A_k) \cdot 100,$$

kde A_v = absorbance testovaného vzorku

A_k = absorbance kontrolního vzorku

Výsledky měření jsou ukázány v Tab. 6, 9, 12 a na Obr. 31, 40 v části výsledky a diskuze.

Reakce byla také provedena bez kyseliny askorbové a bez EDTA. Jestliže z reakce vypustíme kyselinu askorbovou a v extraktu jsou přítomny pro-oxidační látky, může docházet ke zpětné redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} , nutné pro Fentonovu reakci a dochází tak ke zvýšené produkci OH^{\bullet} . Pro zjištění pro-oxidačních vlastností vzorku byla reakce provedena bez kyseliny askorbové. V nepřítomnosti EDTA se ionty železa váží přímo na cukr. Za takových podmínek látky neinhibují degradaci deoxyribózy reakcí s hydroxylovými radikály, ale tím, že chelatují ionty, které pak nemohou reagovat ve Fentonově reakci. Pro zjištění schopnosti chelatovat ionty byla reakce provedena bez EDTA.

Výsledky jsou ukázány v Tab. 6, 9 a na Obr. 32, 33 a 40.

4.10. AKTIVITA VŮČI KYSELINĚ CHLORNÉ

Kyselina chlorná indukuje konverzi kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové (TNB), která vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 412 nm, na kyselinu 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové (DNTB), jejíž absorpční maximum je při 325 nm. Aktivita vůči kyselině chlorné se zjišťuje spektrofotometricky sledováním absorbance při 412 nm.

Příprava činidel:

Syntéza kyseliny chlorné: Byl připraven 1%ní roztok NaOCl a pH tohoto roztoku bylo na potenciometru upraveno na 6,2 s využitím kyseliny sírové. Získaný roztok HOCl se poté naředil destilovanou vodou na takovou koncentraci, aby oxidace TNB nepřesahovala 50 %. Pro každé měření se tato vhodná koncentrace HOCl připravovala

experimentálně. Koncentrace získaného roztoku HOCl se určila spektrofotometricky při vlnové délce 235 nm s využitím extinkčního koeficientu $100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Syntéza kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové (TNB): 3,9 mg DTNB se rozpustilo v 10,0 ml fosfátového pufru a spojilo se s 7,566 mg borohydrátu sodného. Směs se nechala inkubovat po dobu 30 minut při 37°C. Počáteční koncentrace roztoku TNB se zjistila odečtením absorbance při 412 nm s využitím extinkčního koeficientu $13\,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Roztok TNB byl zředěn tak, aby jeho absorbance byla v rozmezí 0,9-1,1.

NaOCl 1%: 455,8 μl roztoku NaOCl bylo převedeno do 50,0 ml destilované vody.

Pufr: KH_2PO_4 -KOH 50 mM, pH 6,6 s EDTA 5mM

6,8045 g KH_2PO_4 a 1,861 g EDTA.2H₂O se navážilo do odměrné baňky na 1000 ml a doplnilo destilovanou vodou po rysku. Hodnota pH byla upravena na potenciometru s využitím 0,1 mM roztoku hydroxidu draselného.

Postup měření a výpočty:

Pro každou sledovanou koncentraci vzorku bylo měření realizováno dvakrát, ve spektrofotometru nastaveném na fotometrickou funkci při vlnové délce 412 nm. Současně byl změřen také kontrolní roztok (vzorek nahrazen pufrům) a porovnávací roztok pro vzorek i kontrolu.

V kyvetě se postupně smíchalo:

Porovnávací roztok	Vzorek
1. 260 μl fosfátového pufru	1. 260 μl roztoku TNB
2. 160 μl vzorku	2. 160 μl vzorku
3. 180 μl roztoku HOCl	3. 180 μl roztoku HOCl

- Po 5-ti minutách byla odečtena absorbance při vlnové délce 412 nm
- Pro zjištění počáteční koncentrace TNB se HOCl nahradila destilovanou vodou.

Z naměřených hodnot bylo vypočítáno % zbývající TNB (nepřeměněné na DTNB) podle vztahu:

$$\% \text{ zbývající TNB} = (A_v / A_k) \cdot 100,$$

kde A_v = absorbance testovaného vzorku v čase $t = 5 \text{ min}$

A_k = absorbance kontrolního vzorku v čase $t = 5 \text{ min}$

Byl sestroyen graf závislosti % zbývající TNB na koncentraci vzorku. Výsledky měření jsou uvedeny na Obr. 17, 24, 34 a 41 v části výsledky a diskuze. Pro potvrzení účinnosti metody byla vždy za stejných podmínek odzkoušena kyselina lipová.

4.11. ZHÁŠENÍ OXIDU DUSNATÉHO

Metoda se zakládá na nepřímém stanovení NO[•]: stanovují se stabilní dekompoziční produkty NO[•] - dusičnany a dusitany. Nitroprusid sodný ve vodném roztoku za fyziologického pH spontánně produkuje oxid dusnatý, který po reakci se vzdušným kyslíkem produkuje dusitanové ionty. Dusitanové ionty přes kyselinu dusitou poskytují nitrační činidlo (N₂O₃), které reaguje s kyselinou sulfanilovou za tvorby diazoniového kationtu, který následně kopuluje s N-(1-naftyl)etylendiaminem za tvorby azosloučeniny vykazující maximum absorpce při 543 nm (Griessova reakce) (viz Obr. 3).

Stanovení byla prováděna třikrát pro každou koncentraci i pro kontrolní vzorek s využitím snímače mikrotitračních desek ELX808 IU Ultra Microplate Readeru (Bio-Tek Instruments, Inc), při vlnové délce 560 nm.

Příprava činidel:

Roztok nitroprusidu sodného (SNP) (20 mM): 60mg se rozpustilo v 10 ml pufru. Pro každé měření byl připraven čerstvý roztok.

Griessovo činidlo: Ve 100 ml H₃PO₄ 25% se rozpustil 1,0 g sulfanilamidu a 0,1 g naftylendiaminu

Roztok pufru o pH 7,4: Ve 100,0 ml destilované vody se rozpustilo 1,15 g Na₂HPO₄, 0,20 g KH₂PO₄, 8,0 g NaCl a 0,200 g KCl. Hodnota pH byla upravena na potenciometru s využitím 0,1 mM KOH.

Postup měření a výpočty:

Do jednotlivých cel na mikrotitrační desce pro 96 cel se postupně přidalo:

1. 100 μl vzorku rozpuštěném v pufru o pH 7,4 (viz níže)
2. 100 μl nitroprusidu sodného 20 mM

Pro zamezení vzdušné oxidace byla deska přikryta průsvitnou folií a pod světelným zdrojem se nechala inkubovat po dobu 60 minut, při teplotě 25°C. Poté bylo přidáno 100 μl Griessova činidla, deska se vložila do spektrofotometru a po 10 minutách byla odečtena absorbance při 560 nm.

Současně byl změřen také kontrolní vzorek (namísto vzorku pufr) a porovnávací roztok pro vzorek i kontrolu, kde Griessovo činidlo bylo nahrazeno kyselinou fosforečnou 25 %.

Z naměřených hodnot bylo vypočítáno % redukce NO podle vztahu:

$$\% \text{ redukce NO} = (A_v / A_k) \cdot 100,$$

kde A_v = absorbance testovaného vzorku

A_k = absorbance kontrolního vzorku

Byl sestroyen graf závislosti % redukce NO na koncentraci vzorku. Výsledky měření jsou uvedeny na Obr. 18 a 25 v části výsledky a diskuze.

4.12. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Statistická významnost naměřených výsledků byla vypočítána pomocí *t*-testu významnosti rozdílu dvou průměrů (pro rovnost rozptylů) podle následujících matematických vztahů (133):

Aritmetický průměr:

$$x = \frac{\sum_{i=1}^a x_i}{a}$$

kde x_i = naměřené hodnoty, a = rozsah souboru

Směrodatná odchylka:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^a (x - x_i)^2}{a - 1}}$$

kde x = aritmetický průměr, x_i = naměřené hodnoty, a = rozsah souboru

Testovací kritérium:

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{a_1 \cdot s_1^2 + a_2 \cdot s_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{a_1 a_2 (a_1 + a_2 - 2)}{a_1 + a_2}}$$

kde x_1 = aritmetický průměr kontrolního souboru, x_2 = aritmetický průměr pokusného souboru, s_1 = směrodatná odchylka kontrolního souboru, s_2 = směrodatná odchylka pokusného souboru, a_1 = počet členů kontrolního souboru, a_2 = počet členů pokusného souboru

Testovacímu kritériu přísluší t-rozdělení se *stupněm volnosti* vypočteným podle vzorce:

$$v = a_1 + a_2 - 2$$

Pokusný soubor se od kontrolního souboru statisticky významně liší v případě, že vypočtené testovací kritérium t je větší než kritická hodnota t_p pro vypočtený stupeň volnosti v na hladině významnosti p ($p = 0,05$) (133).

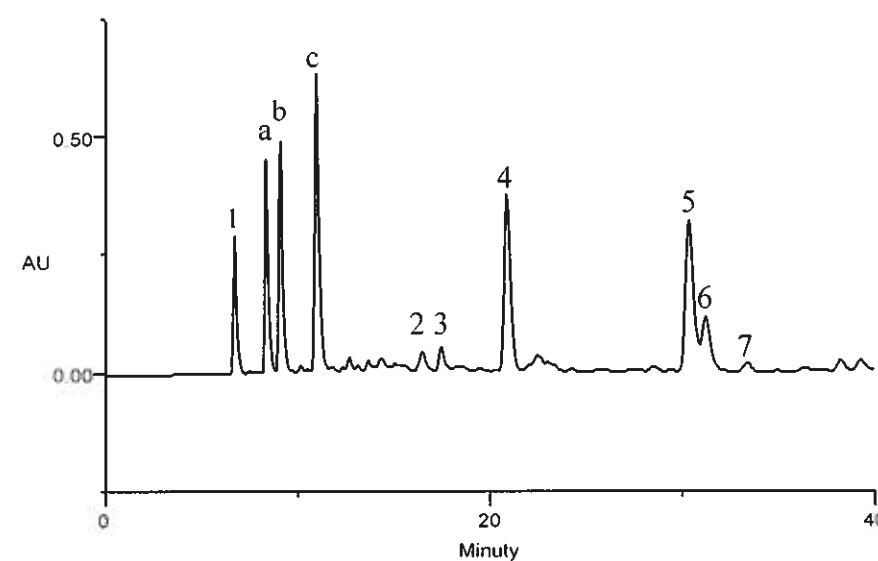
V této práci bylo prováděno vždy 9 paralelních stanovení. Získané hodnoty směrodatných odchylek jsou v grafech znázorněny ve formě chybových úseček.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

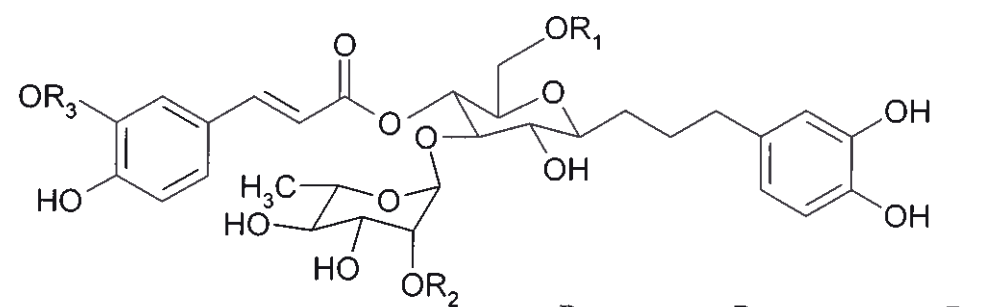
5.1. *BALLOTA NIGRA*

5.1.1. HPLC ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK

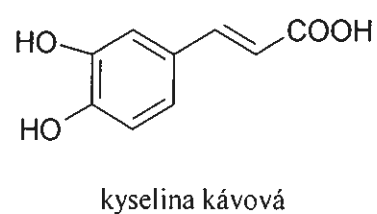
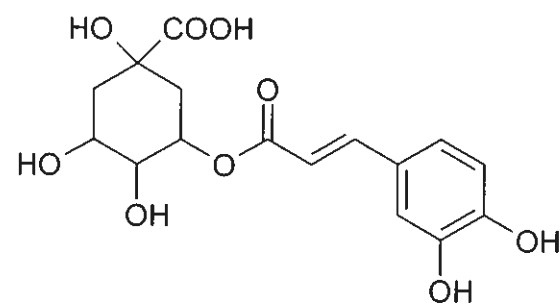
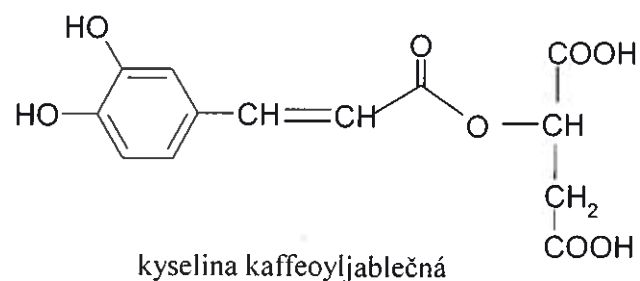
Pomocí HPLC/DAD analýzy nálevu *B. nigra* byl získán chromatogram s 10 hlavními píky, z nichž 7 bylo identifikováno jako: kyselina chlorogenová, kávová, kaffeoyljablečná, ballotetrosid, forsythosid B, verbaskosid a allysonosid (Obr. 13). Všechny tyto látky již byly v *B. nigra* identifikovány (134-141), s výjimkou kyseliny chlorogenové a kávové, které byly popsány poprvé. V extraktu byly zjištěny také látky **a**, **b** a **c** (Obr. 13). Vykazovaly UV spektra s maximy při vlnových délkách 250 a 320 nm a spektrum charakteristické pro deriváty hydroxyskořicových kyselin. Identifikovat tyto látky se nepodařilo. V lyofilizovaném nálevu byl nalezen vysoký obsah fenolických látek (cca 121 g/kg) (Tab. 4), přičemž forsythosid B a látka **c** byly zastoupené v největším množství (až 20.3 a 22.1 % z celkového množství). Nejméně byly zastoupeny kyselina chlorogenová a kyselina kávová (1.5 a 0.7 % z celkového množství fenolů) (Tab. 4). Struktury identifikovaných látek jsou znázorněny na Obr.14.



Obr. 13: HPLC chromatogram fenolických látek v nálevu *Ballota nigra*. Detekce při 320 nm. Píky: (1) ballotetrosid; (2) chlorogenová kyselina; (3) kávová kyselina; (4) kaffeoyljablečná kyselina; (5) forsythosid B; (6) verbaskosid; (7) allysonosid; (a), (b), (c) neidentifikované látky.



	R ₁	R ₂	R ₃
Verbaskosid	H	H	H
Forsythosid B	β-D-apióza	H	H
Ballotetrosid	β-D-apióza	α-L-arabinóza	H
Alyssonosid	β-D-apióza	H	CH ₃



Obr. 14: Struktury derivátů fenyylpropanu identifikované v lyofilizovaném nálevu *Ballota nigra*

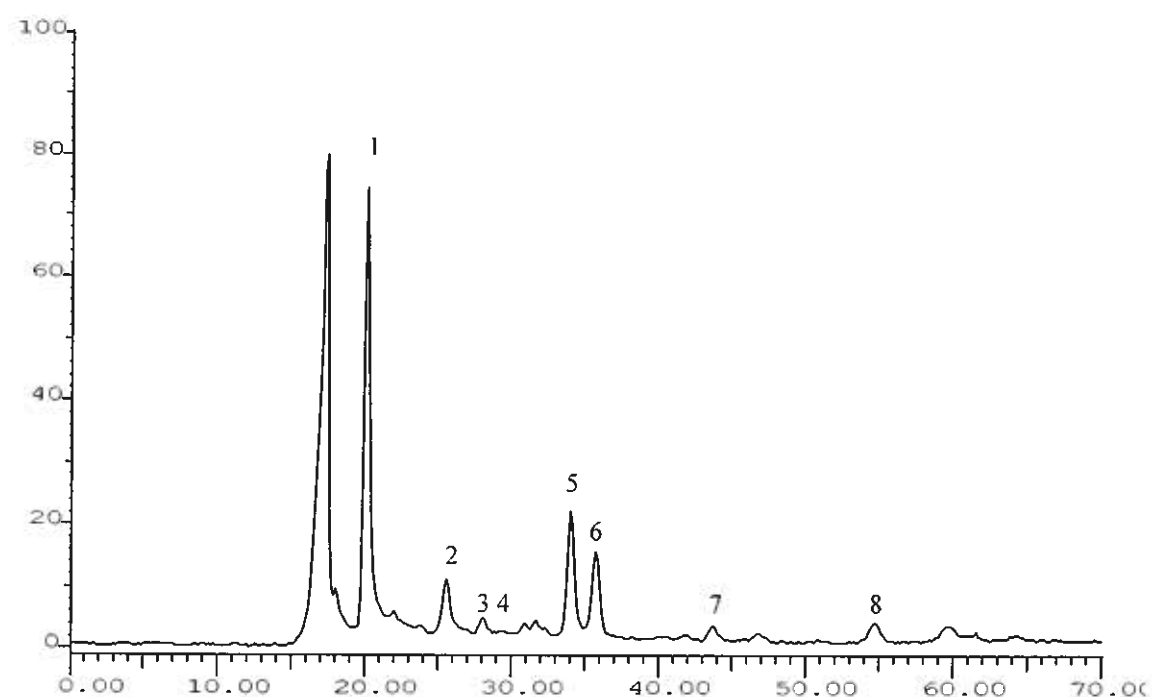
Tab. 4: Fenolické látky nalezené v lyofilizovaném nálevu *Ballota nigra* (mg/kg)^a.

Fenolické látky	Průměrný obsah (mg/kg)	SO
Ballotetrosid (RT 6.7 min)	9499.9	272.5
a (RT 8.3 min)	14985.0	73.9
b (RT 9.1 min)	19269.1	12.0
c (RT 10.9 min)	26760.6	25.6
Chlorogenová kyselina (RT 16.5 min)	1850.6	33.4
Kávová kyselina (RT 17.4 min)	796.9	3.6
Kaffeoyljablečná kyselina (RT 20.9 min)	11927.4	918.0
Forsythosid B (RT 30.3 min)	24616.6	1327.0
Verbaskosid (RT 31.2 min)	10330.9	1445.3
Alyssonosid (RT 33.4 min)	1171.2	14.4
Σ	121208.3	

^a Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří paralelních měření. SO, směrodatná odchylka; Σ, celkové množství stanovených fenolických látek.

5.1.2. HPLC ANALÝZA ORGANICKÝCH KYSELIN

S využitím HPLC/UV analýzy bylo v nálevu *B. nigra* identifikováno a kvantifikováno 8 organických kyselin: šťavelová, akonitová, citrónová, askorbová, jablečná, chinová, šikimová a fumarová kyselina (Obr. 15). Tyto látky byly v *B. nigra* identifikovány poprvé. Obsah organických kyselin je poměrně vysoký (cca 14 g/kg), téměř 58.9 % tvořila kyselina chinová (Tab. 5). Minoritními látkami byly kyselina šikimová a kyselina fumarová, kterých bylo méně než 0.1 % z celkového množství organických kyselin (Tab. 5).



Obr. 15: HPLC chromatogram organických kyselin v nálevu *Ballota nigra*. Detekce při 214 nm. Píky: (1) šťavelová kyselina; (2) akonitová kyselina; (3) citrónová kyselina; (4) askorbová kyselina; (5) jablečná kyselina; (6) chinová kyselina; (7) šikimová kyselina; (8) fumarová kyselina.

Tab. 5: Organické kyseliny v lyofilizovaném nálevu *Ballota nigra* (mg/kg)^a.

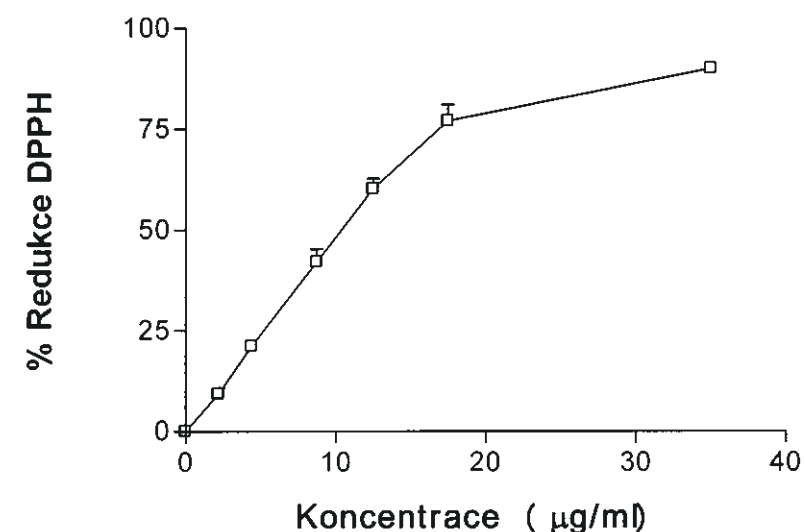
Organické kyseliny	Průměrný obsah (mg/kg)	SO
Kyselina šťavelová (RT 19.6 min)	831.20	15.08
Kyselina akonitová (RT 25.1 min)	71.48	1.71
Kyselina citrónová (RT 27.9 min)	475.37	48.97
Kyselina askorbová (RT 29.6 min)	1475.10	429.67
Kyselina jablečná (RT 33.9 min)	2787.92	74.69
Kyselina chinová (RT 35.0 min)	8014.32	853.22
Kyselina šikimová (RT 43.2 min)	7.50	1.38
Kyselina fumarová (RT 58.4 min)	6.15	0.28
Σ	13597.55	

^aVýsledné hodnoty jsou průměrem ze tří paralelních měření. SO, směrodatná odchylka; Σ, celkové množství stanovených fenolických látek.

5.1.3. ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

5.1.3.1. Aktivita vůči DPPH

Základní informace o schopnosti nálevu *B. nigra* zhaset volné radikály byla získána s využitím testu DPPH. Lyofilizovaný nálev *B. nigra* silně zhasel DPPH radikál v závislosti na koncentraci ($IC_{25} = 4.81 \mu\text{g/ml}$) (Obr.16).



Obr. 16: Účinek nálevu *B. nigra* na redukci DPPH radikálu. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

5.1.3.2. Aktivita vůči superoxidovému radikálu

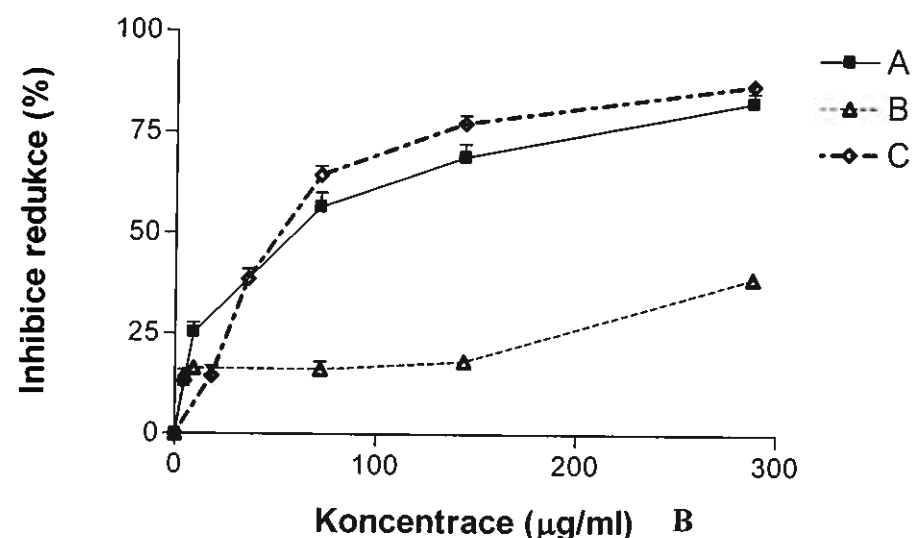
5.1.3.2.1. Superoxid generovaný enzymaticky

Antiradikálová aktivita byla dále sledována v systému xantin/xantinoxidáza. V tomto systému extrakt vykazoval aktivitu (Obr. 17A) a pozorovaný účinek byl závislý na koncentraci extraktu ($IC_{25} = 14.55 \mu\text{g/ml}$). Sledován byl také účinek na aktivitu xantinoxidázy, neboť inhibicí tohoto enzymu může také docházet ke snížení redukce nitrotetrazolinové modři (42). Za tímto účelem byl proveden kontrolní experiment, ve kterém se zjišťoval účinek nálevu na konverzi xantinu na kyselinu močovou (Obr. 17B). Byl prokázán slabý inhibiční efekt vůči XO ($IC_{25} = 142.65 \mu\text{g/ml}$).

5.1.3.2.2. Superoxid generovaný neenzymaticky

Aby se potvrdila schopnost zhaset také superoxidový radikál použil se také test, kde k produkci radikálu slouží PMS, NADH a kyslík. V tomto systému extrakt zhasel

superoxidový radikál v závislosti na koncentraci s hodnotou $IC_{25} = 26.08 \mu\text{g/ml}$ (Obr. 17C). Různé hodnoty IC_{25} získané v obou systémech mohou být způsobené vyšší produkcí radikálu v neenzymatické zkoušce.



Obr. 17: Účinek nálevu *Ballota nigra* na: (A) redukcí NBT indukovanou superoxidovým radikálem generovaným X/XO systémem; (B) na aktivitu XO; (C) redukcí NBT indukovanou superoxidovým radikálem generovaným NADH/PMS systémem. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

5.1.3.3. Aktivita vůči hydroxylovému radikálu

V testu zhašení hydroxylového radikálu nebyla pozorována prakticky žádná antiradikálová aktivita (Tab. 6). Jestliže z testovacího modelu vypustíme kyselinu askorbovou a v extraktu jsou přítomny pro-oxidační látky, může docházet ke zpětné redukcí Fe^{3+} na Fe^{2+} , nutných pro Fentonovu reakci a produkce OH^{\cdot} se zvyšuje (42). Pro zjištění možných pro-oxidačních vlastností vzorku byla reakce provedena bez kyseliny askorbové. Jak lze vidět z Tab. 6, nálev *B. nigra* byl velmi účinnou náhradou za kyselinu askorbovou, zejména v koncentracích vyšších než $2.25 \mu\text{g/ml}$. K fragmentaci deoxyribózy dochází také pokud tvorba hydroxylových radikálů indukovaná Fe^{3+} -askorbát- H_2O_2 systémem je provedena v nepřítomnosti chelátoru - EDTA. V nepřítomnosti EDTA se ionty železa váží přímo na cukr. Za takových podmínek látky neinhibují degradaci deoxyribózy reakcí s hydroxylovými radikály, ale tím, že chelatují

ionty železa, které pak nemohou reagovat ve Fentonově reakci (142). Pro zjištění schopnosti chelátovat ionty byla proto reakce provedena bez EDTA. Získané výsledky ukázaly, že nálev *B. nigra* neměl schopnost chelátovat ionty Fe^{3+} (Tab. 6). Hydroxylový radikál je známý jako nejreaktivnější radikál, který může atakovat téměř každou molekulu v živé buňce (143). Hydroxylové radikály jsou produkovány *in vivo* Fentonovou reakcí, ve které jsou zahrnuty přechodné kovy. Redukující látky jako je např. kyselina askorbová mohou tuto reakci urychlit (144). Zdá se, že *B. nigra* stimuluje tvorbu hydroxylových radikálů v nepřítomnosti kyseliny askorbové a toto zjištění by mohlo být využitelné v případě patologických stavů jako je Wilsonova choroba či hemochromatóza, kde je zastoupen velký počet nechelátovaných přechodných kovů (145,146).

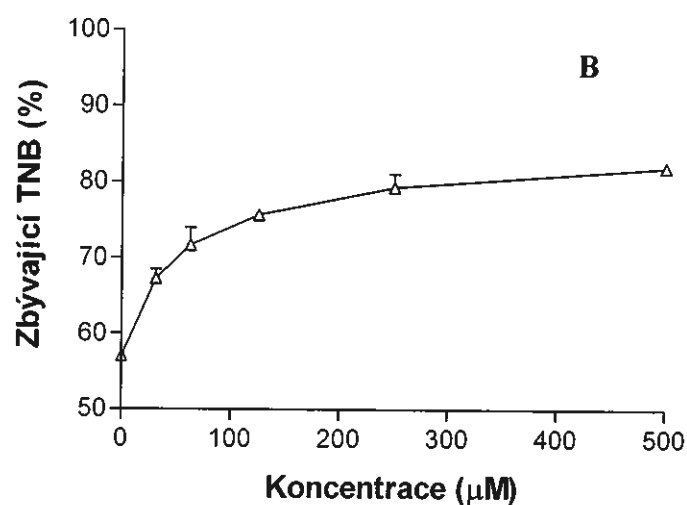
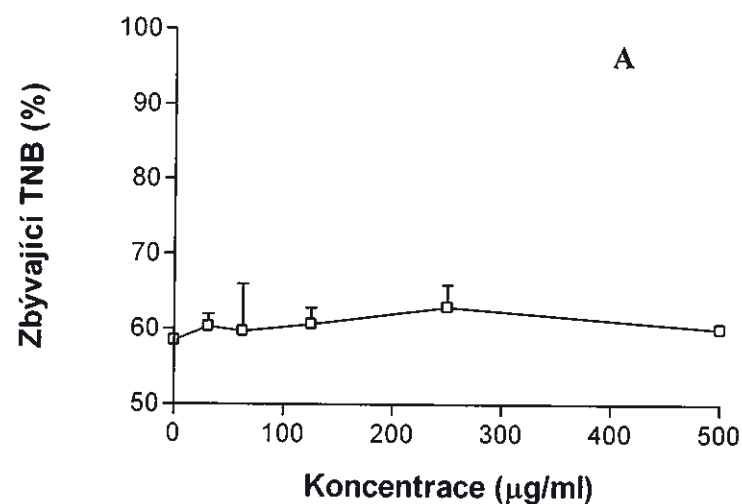
Tab. 6: Hodnoty absorbance a procenta redukce ve zkoušce s deoxyribózou a hodnoty absorbance ve zkoušce provedené bez kyseliny askorbové (-AA) či EDTA (-EDTA).

<i>Ballota nigra</i> lyofilizovaný nálev (µg/ml)	ABS	Redukce radikálu (%)	ABS (-AA)	ABS (-EDTA)
0.00	0.396	0.0	0.402	0.302
1.13	0.370	7.1	0.411	0.325
2.25	0.386	3.0	0.427	0.347
4.50	0.391	1.1	0.480	0.348
9.00	0.386	2.9	0.499	0.331
18.00	0.422	-	0.573	0.327

5.1.3.4. Kyselina chlorná

Reaktivní kyslíkové druhy produkované *in vivo* aktivovanými fagocytujícími buňkami zahrnují také kyselinu chlornou. Kyselina chlorná je velmi silný oxidant, který reaguje pohotově s mnohými biologickými molekulami. HOCl inaktivuje α_1 -antiproteinázu, aktivuje kolagenázy a gelatinázy, vyčerpává antioxidační vitamíny jako jsou kyselina askorbová a inaktivuje antioxidační enzymy jako je kataláza (142,147,148).

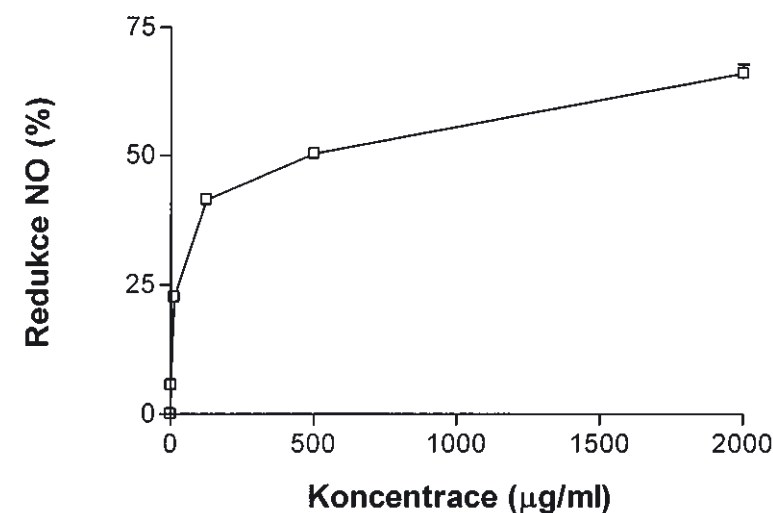
Aktivita vůči HOCl byla zkoumána jako schopnost zamezit konverzi TNB na DTNB. Nálev *B. nigra* v této zkoušce nevykazoval žádnou aktivitu vůči HOCl (Obr. 17A). Jako standard byla za stejných podmínek odzkoušena kyselina lipoová, která účinně zhasěla HOCl v závislosti na koncentraci, v koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$ měla 82% protektivní účinek (Obr. 17B). Z tohoto vyplývá, že tradiční využití *B. nigra* k léčení zánětů nelze přisoudit zhasení kyseliny chlorné.



Obr. 17: Účinek nálevu *Ballota nigra* (A) a kyseliny lipoové (B) na oxidaci TNB způsobenou kyselinou chlornou. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

5.1.3.5. Aktivita vůči oxidu dusnatém

Oxid dusnatý je velmi krátce žijící volný radikál s mnohými fyziologickými, ale i patologickými účinky (59). Nálev *B. nigra* vykazoval značnou aktivitu vůči oxidu dusnatému v závislosti na koncentraci s hodnotou $\text{IC}_{25} = 122.34 \mu\text{g/ml}$ (Obr. 18).



Obr. 18: Účinek nálevu *Ballota nigra* na redukci NO radikálu. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

Antioxidační aktivita sledovaná u lyofilizovaného nálevu *B. nigra* je zřejmě dána přítomností fenolických glykosidů. Jedním z nich je i verbaskosid, o jehož antioxidačních vlastnostech bylo publikováno již několik studií. Značná antioxidační aktivita byla pro verbaskosid nalezena v následujících experimentálních modelech: verbaskosid prokazatelně potlačoval NADPH/ CCl_4 indukovanou lipidovou peroxidaci v jaterních mikrosomech potkana (149), inhiboval Cu^{2+} -indukovanou LDL oxidaci (141), vykazoval schopnost zhasení $\text{O}_2^{\cdot-}$ a OH^{\cdot} testovanou s využitím technik spinové rezonance (150), zhasěl $\text{O}_2^{\cdot-}$ produkovaný NADH/PMS (151) či X/XO systémem (152), testován byl na zhasení ABTS radikálu (153) či na schopnost zabránit destrukci DNA způsobenou OH^{\cdot} z Fentonovy reakce (154).

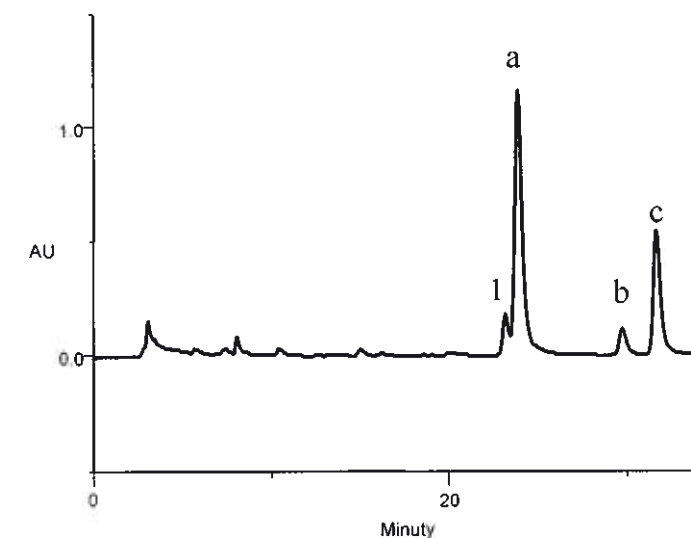
Také antioxidační aktivita forsythosidu B již byla dříve studována. Siciliano et al. měřili schopnost forsythosidu B zhaset radikál ABTS (153). Byla zkoušena také jeho aktivita vůči DPPH (155) a protektivní účinek na volnými radikály způsobené poškození

endotelium-dependentní relaxace na izolované aortě potkana (156). Z dalších látek se na antioxidační aktivitě mohou podílet kyselina chlorogenová a kávová. Pro kyselinu kávovou a chlorogenovou byla nalezena antioxidační aktivita s využitím FRAP metody či zhášení ABTS radikálu (157), metodou odbarvování β -karotenu a zhášení DPPH (105). Ke sledované antioxidační aktivitě mohou přispívat také obsažené organické kyseliny, u kterých byla antioxidační aktivita rovněž popsána (158). Pro-oxidační aktivita výluhů sledovaná ve zkoušce s hydroxylovým radikálem může být částečně dána obsahem kyseliny kávové a chlorogenové, u kterých byly pro-oxidační účinky již dříve popsány (99,159).

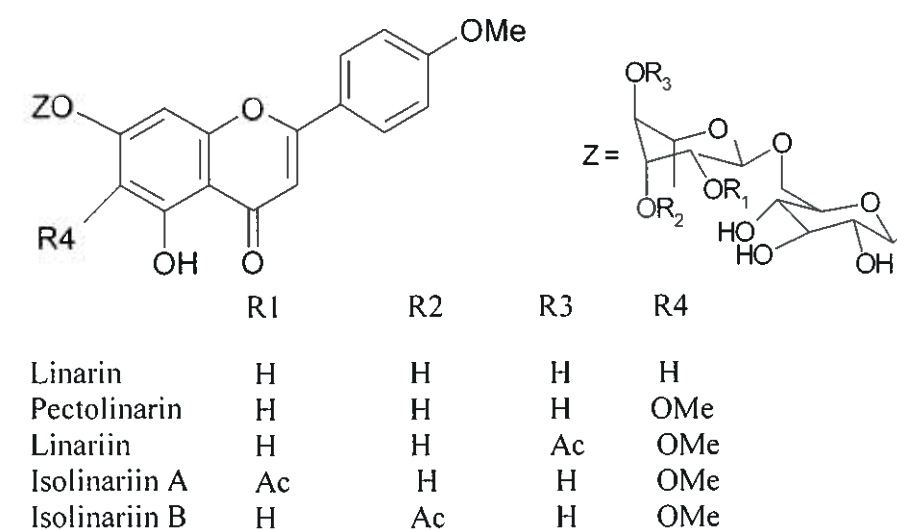
5.2. LINARIA VULGARIS

5.2.1. HPLC ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK

Analýza fenolických látek v *L. vulgaris* odhalila přítomnost čtyř látek, ze kterých se podařilo identifikovat pouze linarin (akacetin-7-O-rutinosid) (Obr. 19, Tab. 7). Tato látka již byla dříve v *L. vulgaris* popsána (134). Další tři detekované látky (látky a, b a c) vykazovaly identická spektra jako linarin s maximy při vlnových délkách 273 a 330 nm. Shodná maxima vykazovalo spektrum pektolinarinu popsaného u *Cirsium coloradense* (Asteraceae) (276 nm a 330 nm) (160). Přítomnost isolinariinu A a isolinariinu B, acetylovaných flavonoidních glykosidů, které se vyznačují spektrem se třemi maximy při vlnových délkách 213, 277 a 329 nm a které byly dříve popsány u jiného druhu *Linaria* (*L. japonica*) (161) nebyla zaznamenána. Pravděpodobně došlo k jejich hydrolýze během přípravy nálevu. Lyofilizovaný nálev z *L. vulgaris* obsahoval velké množství fenolických látek (cca. 65 g/kg), přičemž největší podíl z detekovaných látek zaujímala látka a (cca 61.3 % celkových fenolů) (Tab. 7). Linarin a látka c byly přítomny v menších množstvích, reprezentující cca 6.0 % celkových fenolických látek (Tab. 7). Struktury vybraných flavonoidů popsaných v druhu *Linaria* jsou znázorněny na Obr. 20.



Obr. 19: HPLC profil fenolických látek v nálevu *Linaria vulgaris*. Píky: (1) linarin; (a) (b) a (c) neidentifikované látky



Obr. 20: Struktura některých flavonů vyskytujících se v druhu *Linaria*

Tab. 7: Fenolické látky v lyofilizovaném nálevu *Linaria vulgaris* (mg/kg)^a

Fenolické látky	Průměrný obsah (mg/kg)	SO
Linarin (RT 23.2 min)	3840.9	5.0
a (RT 23.8 min)	39576.1	430.2
b (RT 29.7 min)	3825.0	60.7
c (RT 31.6 min)	17340.1	201.8
Σ	64582.1	

^a Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří paralelních měření. SO, směrodatná odchylka; Σ, celkové množství stanovovaných fenolických látek.

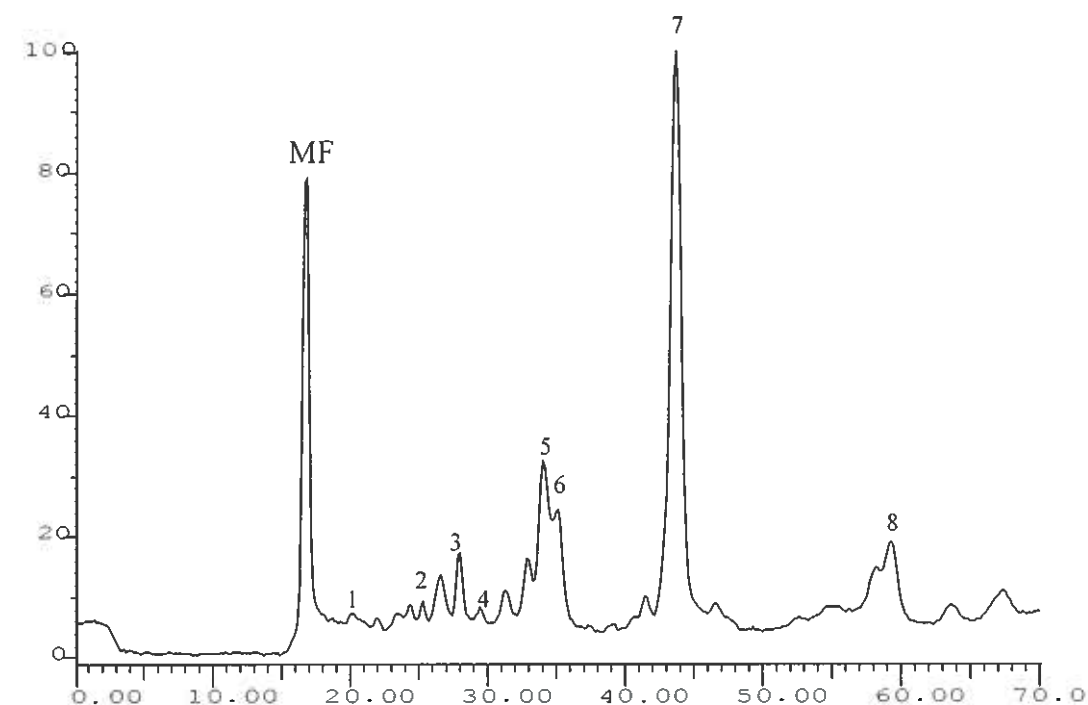
5.2.2. HPLC ANALÝZA ORGANICKÝCH KYSELIN

S využitím HPLC/UV analýzy se podařilo identifikovat a kvantifikovat 8 organických kyselin: šťavelová, akonitová, citrónová, ketoglutarová, askorbová, jablečná, šikimová a fumarová (Obr. 21). Tyto látky byly identifikovány v *L. vulgaris* poprvé. Jejich celkové množství je 36 g/kg, přičemž kyselina askorbová byla převládající látkou v množství cca 23.5 g/kg představující 65.5 % z celkových organických kyselin (Tab. 8). Značný byl také obsah kyseliny jablečné (25.3 % z celkového množství organických kyselin) (Tab. 8). Nejmenší podíl na celkových kyselinách měly kyselina šťavelová, akonitová a fumarová, které byly přítomny v množství menším než 0.2 % (Tab. 8).

Tab. 8: Organické kyseliny v lyofilizovaném nálevu *Linaria vulgaris* (mg/kg)^a

Organická kyselina	Průměrný obsah (mg/kg)	SO
Šťavelová kyselina (RT 19.6 min)	62.5	14.0
Akonitová kyselina (RT 25.1 min)	30.1	2.2
Citrónová kyselina (RT 27.9 min)	2167.0	78.1
Ketoglutarová kys. (RT 30.04 min)	651.0	24.3
Askorbová kyselina (RT 29.6 min)	23450.0	310.0
Jablečná kyselina (RT 33.9 min)	9050.4	129.3
Šikimová kyselina (RT 43.2 min)	395.0	0.7
Fumarová kyselina (RT 58.4 min)	26.0	0.2
Σ	35801.2	

^a Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří paralelních měření. SO, směrodatná odchylka; Σ, celkové množství stanovovaných fenolických látek.

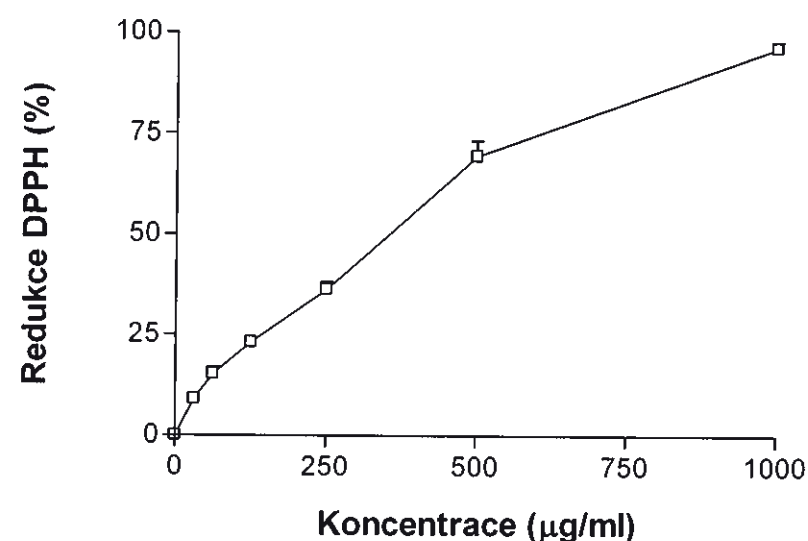


Obr. 21: HPLC profil organických kyselin v nálevu z *Linaria vulgaris*. Detekce při 214 nm. Píky: (MF) mobilní fáze; (1) šťavelová kyselina; (2) akonitová kyselina; (3) citrónová kyselina; (4) ketoglutarová kyselina; (5) askorbová kyselina; (6) jablečná kyselina; (7) šikimová kyselina; (8) fumarová kyselina.

5.2.3. ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

5.2.3.1. Aktivita vůči DPPH

Ve zkoušce s DPPH extrakt *L. vulgaris* významně redukoval množství radikálu v závislosti na koncentraci ($IC_{50} = 353.85 \mu\text{g/ml}$) (Obr. 22)



Obr. 22: Účinek nálevu *Linaria vulgaris* na redukci DPPH radikálu. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

5.2.3.2. Aktivita vůči superoxidovému radikálu

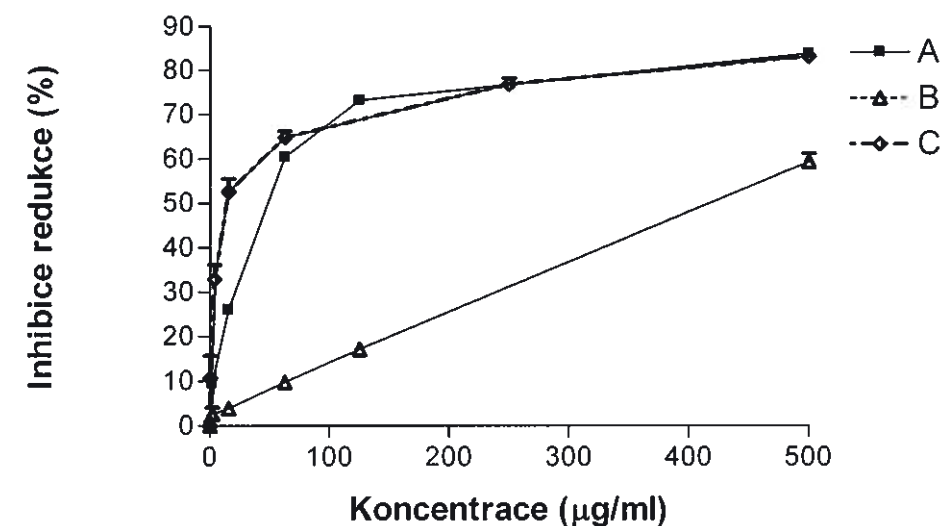
5.2.3.2.1. Superoxid generovaný enzymaticky

Extrakt vykazoval značnou superoxid-zhášecí aktivitu s využitím systému X/XO (Obr. 23A) a sledovaný efekt byl závislý na koncentraci ($IC_{50} = 353.85 \mu\text{g/ml}$). Pro zjištění účinku extraktu na samotný enzym (42) byl proveden kontrolní experiment, který sledoval efekt nálevu na přeměnu xantinu na kyselinu močovou (Obr. 23B). Extrakt v testovaných koncentracích vykazoval slabý inhibiční účinek na XO, takže nebylo možné s přesností určit efekt vůči superoxidovému radikálu.

5.2.3.2.2. Superoxid generovaný neenzymaticky

Pro potvrzení zhášecí aktivity extraktu byl proveden experiment s využitím neenzymového systému PMS/NADH/ O_2 pro produkci superoxidového radikálu.

Testovaný extrakt inhiboval tvorbu formazanu v závislosti na koncentraci s hodnotou $IC_{50} = 14.11 \mu\text{g/ml}$ (Obr. 23C).



Obr. 23: Účinek nálevu *Linaria vulgaris* na: (A) redukci NBT indukovanou superoxidovým radikálem generovaným X/XO systémem; (B) aktivitu XO; (C) redukci NBT indukovanou superoxidovým radikálem generovaným NADH/PMS systémem. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

5.2.3.3. Aktivita vůči hydroxylovému radikálu

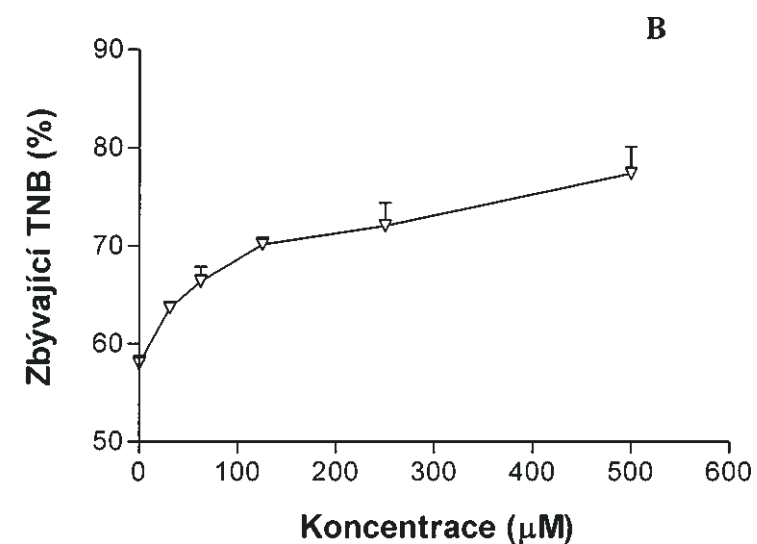
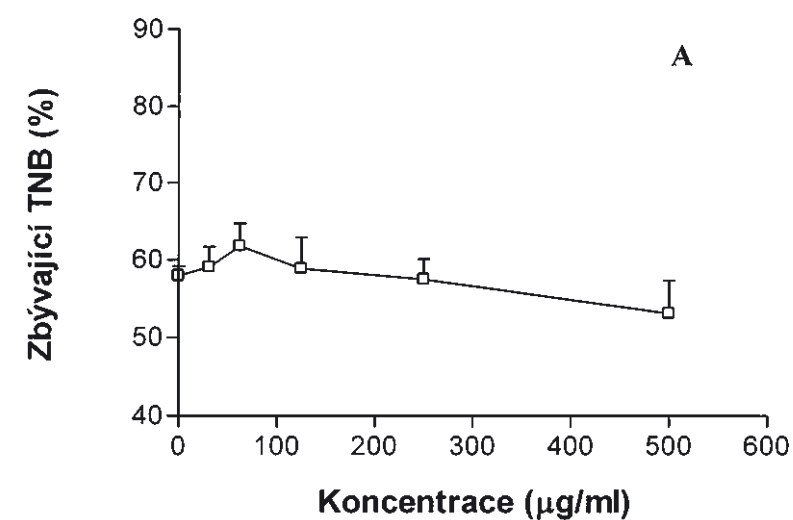
Tab. 9 uvádí výsledky testování aktivity nálevu oproti hydroxylovému radikálu ve zkoušce s deoxyribózou. Nálev *L. vulgaris* nevykazoval zřetelnou aktivitu jak v modelu s přidavkem EDTA tak bez přidavku této látky, tudíž nezháší významně hydroxylový radikál a nedisponuje schopností chelátovat ionty kovů. Zajímavé výsledky byly zjištěny po provedení zkoušky v nepřítomnosti kyseliny askorbové. V koncentracích vyšších než $31.25 \mu\text{g/ml}$ extrakt *L. vulgaris* vykazoval velmi silnou pro-oxidační aktivitu (Tab. 9). *L. vulgaris* tedy stimuluje tvorbu hydroxylových radikálů v nepřítomnosti kyseliny askorbové. Podobných výsledků bylo dosaženo také v případě lyofilizovaného nálevu *B. nigra* a tak i zde se nabízí perspektiva dalšího studia pro využití u patologických stavů jako je Wilsonova choroba či hemochromatóza, kde je zastoupen velký počet nechelátovaných přechodných kovů (145,146).

Tab. 9: Hodnoty absorbance a procenta redukce ve zkoušce s deoxyribózou a hodnoty absorbance ve zkoušce provedené bez kyseliny askorbové (-AA) či EDTA (-EDTA).

<i>Linaria vulgaris</i>				
lyofilizovaný nálev ($\mu\text{g/ml}$)	ABS	Redukce radikálu (%)	ABS (-AA)	ABS (-EDTA)
0.00	0.480	-	0.370	0.351
7.81	0.410	14.5	0.356	0.327
15.63	0.403	16.1	0.357	0.327
31.25	0.433	9.2	0.398	0.323
62.50	0.447	6.7	0.465	0.327
125.00	0.499	-	0.547	0.328

5.2.3.4. Aktivita vůči kyselině chlorné

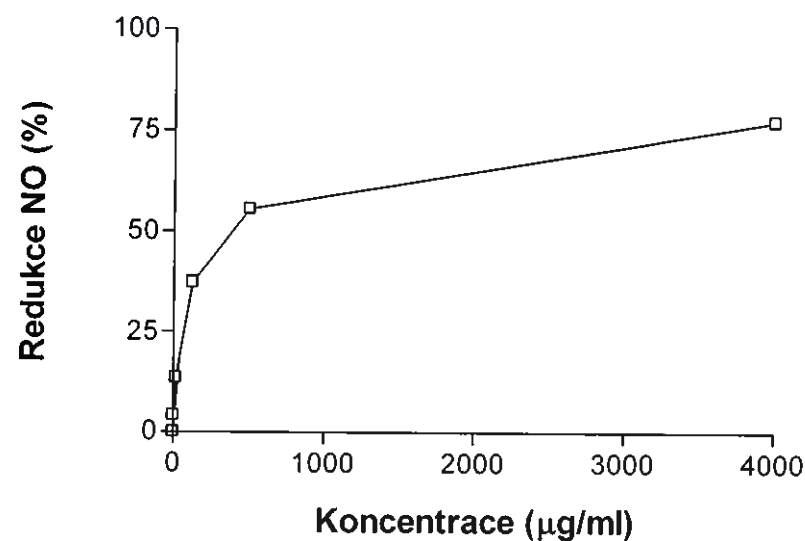
Aktivita vůči HOCl byla zkoumána jako schopnost inhibovat přeměnu TNB na DTNB. V této zkoušce nebyla pozorována žádná aktivita nálevu *L. vulgaris* oproti HOCl (Obr. 24A). Pro ověření správnosti metody byl za stejných podmínek testován standard - kyselina lipoová, která účinně zhasela HOCl v závislosti na koncentraci. V koncentraci $c = 500 \mu\text{g/ml}$ inhibovala reakci z 80 % (Obr. 24B). Tradiční využití *L. vulgaris* jako protizánětlivého agens (134) nelze dávat do souvislosti se zhasením kyseliny chlorné.



Obr. 24: Účinek nálevu *L. vulgaris* (A) a kyseliny lipoové (B) na oxidaci TNB indukovanou kyselinou chlornou. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

5.2.3.5. Aktivita vůči oxidu dusnatému

Nálev *L. vulgaris* byl také testován vůči oxidu dusnatému. NO je velmi důležitým mediátorem v zánětlivých procesech: je produkován v místě zánětu působením NO-syntázy (54). Byla zjištěna významná aktivita vůči NO, která se zvyšovala v závislosti na koncentraci, přičemž hodnota IC₂₅ byla stanovena na 68.95 µg/ml (Obr. 25). Tato vysoká aktivita oproti NO by mohla souviset s protizánětlivými účinky *L. vulgaris* (134).



Obr. 25: Účinek nálevu *L. vulgaris* na redukcí NO radikálu. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

Antioxidační aktivita nálevu *L. vulgaris* zjištěná v těchto studiích je zřejmě dána obsahem flavonoidů, které jsou svými antioxidačními účinky známé (3,162). O antioxidační aktivitě *L. vulgaris* doposud nebyl dostatek informací, stejně tak jako o aktivitě jejích obsahových látek. Yokozawa et al. zkoumali aktivitu linarinu, akacetinu, pektolinarinu a pektolinaringeninu oproti radikálu DPPH (163). Akacetin byl studován na schopnost poskytovat elektron pro extracelulární redukcí kyanidu železitého v lidských erythrocytech v práci Fiorani et al. (164). Určitý podíl na sledované antioxidační aktivitě mají také organické kyseliny, jejichž antioxidační účinky již byly dříve popsány (158). Také další látky obsažené v nálevu *L. vulgaris* zřejmě přispívají ke sledované aktivitě. Silný pro-oxidační efekt zaznamenaný ve Fentonově zkoušce

provedené bez kyseliny askorbové může být způsoben vysokým obsahem kyseliny askorbové v samotném nálevu *L. vulgaris*.

5.3. BRASSICA OLERACEA var. COSTATA – zevní listy

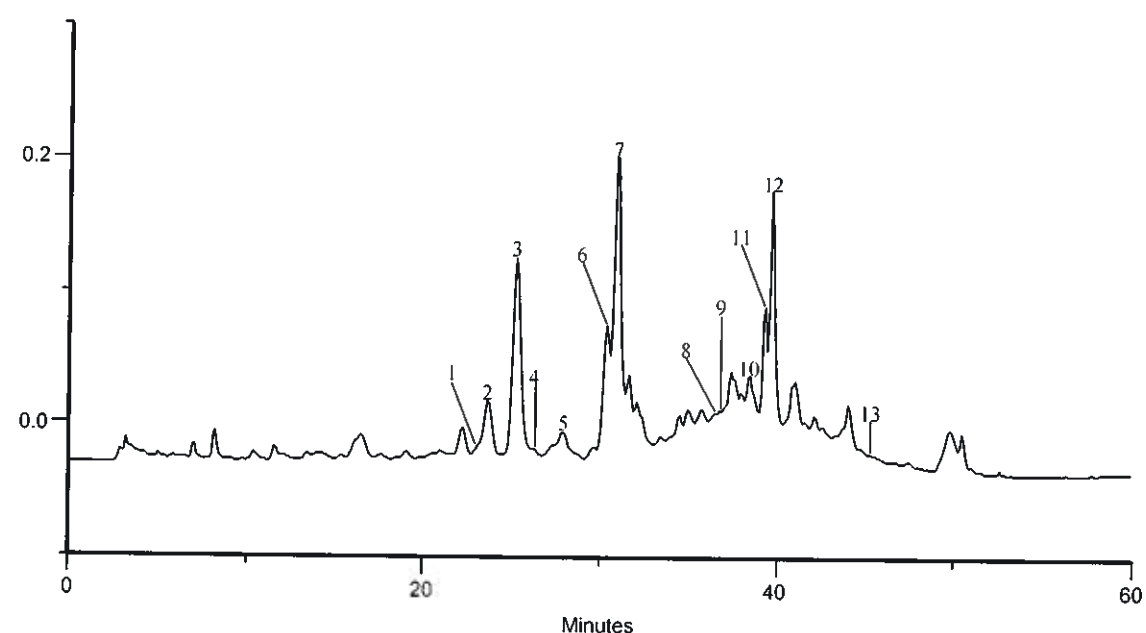
5.3.1. HPLC ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK

Vodné extrakty zevních listů *Brassica oleracea L. var. costata* se vyznačovaly rozdílným složením fenolických látek (Tab. 10). Ve vzorku D byly zjištěny pouze tři látky: kempferol 3-*O*-soforotriosid, kempferol 3-*O*-(sinapoyl)-soforosid a kempferol 3-*O*-(feruloyl)-soforotriosid. Ve vzorku C byl vedle kempferol 3-*O*-(feruloyl)-soforotriosidu, identifikován kempferol 3-*O*-soforosid-7-*O*-glukosid, kempferol 3-*O*-soforotriosid-7-*O* soforosid, kempferol 3-*O*-(feruloyl)-soforosid, kempferol 3-*O*-soforosid a kempferol 3-*O*-glukosid. Ve vzorku B byly nalezeny všechny výše popsané látky a dále: kempferol 3-*O*-soforotriosid-7-*O*-glukosid, kempferol 3-*O*-(metoxykaffeoyl/kaffeoyl)-soforosid-7-*O*-glukosid, kempferol 3-*O*-(sinapoyl/kaffeoyl) soforosid-7-*O*-glukosid a kempferol 3-*O*-(feruloyl/kaffeoyl)-soforosid-7-*O*-glukosid.

Vzorek A měl chemický profil složený z 12ti výše zmíněných derivátů kempferolu a navíc obsahoval kempferol 3-*O*-soforosid-7-*O*-soforosid (Obr. 26 a Tab. 10). Tyto látky již byly identifikovány v metanolvých extraktech zevních listů „tronchuda“ zelí (165). Vzorek A se vyznačoval nejvyšším obsahem celkových fenolických látek (cca 1231 mg/kg) (Tab. 10), přičemž kempferol 3-*O*-(feruloyl/kaffeoyl)-soforosid-7-*O*-glukosid byl hlavní složkou tvořící 26 %. Vzorek B měl nižší obsah fenolických látek (asi 32 mg/kg) (Tab. 10), kde téměř 32 % z celkového obsahu zaujímal kempferol 3-*O*-soforosid. Hlavním derivátem kempferolu ve vzorku D byl kempferol 3-*O*-(feruloyl)-soforotriosid a nejméně fenolických látek bylo ve vzorku C (Tab. 10). Struktura jednotlivých derivátů kempferolu je znázorněna na Obr. 27.

Jak již bylo pozorováno dříve (165) byl zaznamenán pokles v obsahu fenolických látek mezi listopadem a prosincem, který je více zřetelný u organicky pěstovaných vzorků. Nejnižší množství celkových fenolů měl vzorek C, sbíraný v prosinci a pěstovaný organicky. Protože na rozdíl od vzorku pěstovaného konvenčně se tento vzorek vyznačoval rozvinutějšími, mohutnějšími listy, lze se domnívat, že se buňky tohoto vzorku v období zimy soustředily spíše na růst rostliny než na tvorbu sekundárních

látek. Vzorky pěstované organicky vykazovaly vyšší obsah fenolických látek než vzorky pěstované za tradičních podmínek, s výjimkou vzorků z prosince. Předpokládá se, že minerální látky a/nebo pesticidy užívané v tradičním pěstitelství, mohou interferovat s biosyntézou flavonoidů a tak snižovat množství fenolických látek (165).



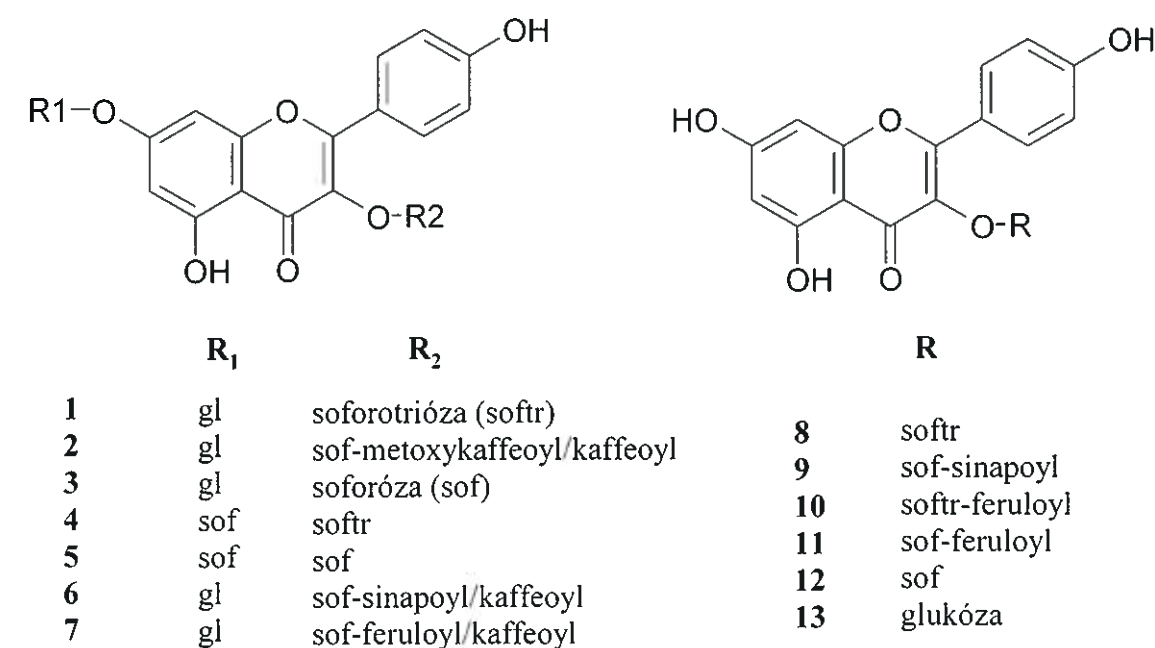
Obr. 26: HPLC chromatogram fenolických látek v zevních listech „tronchuda“ zeli. Detekce při 330 nm. Píky: (1) kempferol 3-*O*-soforotriosid-7-*O*-glukosid; (2) kempferol 3-*O*- (metoxykaffeoyl/kaffeoyl)-soforosid-7-*O*-glukosid; (3) kempferol 3-*O*-soforosid-7-*O*-glukosid; (4) kempferol 3-*O*-soforotriosid-7-*O*-soforosid; (5) kempferol 3-*O*-soforosid-7-*O*-soforosid; (6) kempferol 3-*O*-(sinapoyl/kaffeoyl)-soforosid-7-*O*-glukosid; (7) kempferol 3-*O*- (feruloyl/kaffeoyl)-soforosid-7-*O*-glukosid; (8) kempferol 3-*O*-soforotriosid; (9) kempferol 3-*O*-(sinapoyl)-soforosid; (10) kempferol 3-*O*-(feruloyl)-soforotriosid; (11): kempferol 3-*O*-(feruloyl)-soforosid; (12) kempferol 3-*O*-soforosid; (13) kempferol 3-*O*-glukosid.

Tab. 10: Fenolické látky v zevních listech „tronchuda“ zeli (mg/kg lyofilizovaného extraktu)^a

fenolické látky ^b	Vzorky							
	A		B		C		D	
	Průměrný obsah	SO	Průměrný obsah	SO	Průměrný obsah	SO	Průměrný obsah	SO
1+2 (RT 24.0, 24.2 min)	73.1	2.1	nk	-	nd	-	nd	-
3+4 (RT 25.8, 26.0 min)	236.9	5.2	8.2	0.5	nq	-	nd	-
5 (RT 27.8 min)	46.3	6.9	nd	-	nd	-	nd	-
6 (RT 30.7 min)	119.1	5.9	nk	-	nd	-	nd	-
7 (RT 31.2 min)	323.0	7.0	2.5	0.1	nd	-	nd	-
8 (RT 36.5 min)	26.1	0.1	nk	-	nd	-	nk	-
9 (RT 37.4 min)	nk	-	2.6	0.0	nd	-	nk	-
10 (RT 38.5 min)	85.8	1.5	7.4	0.0	nk	-	5.9	0.5
11 (RT 39.3 min)	99.8	1.8	1.3	0.1	nk	-	nd	-
12 (RT 39.7 min)	221.2	5.2	10.6	0.1	nk	-	nd	-
13 (RT 44.1 min)	nk	-	nk	-	nk	-	nd	-
Σ	1231.2		32.6		-		5.9	

^a Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří paralelních měření. SO, směrodatná odchylka; Σ, celkové množství stanovených fenolických látek. Vzorek A = listopad 2002, organické pěstování; B = listopad 2002, tradiční; C = prosinec 2002, organické; D = prosinec 2002, tradiční, nk – nelze kvantifikovat; nd – nedetekováno.

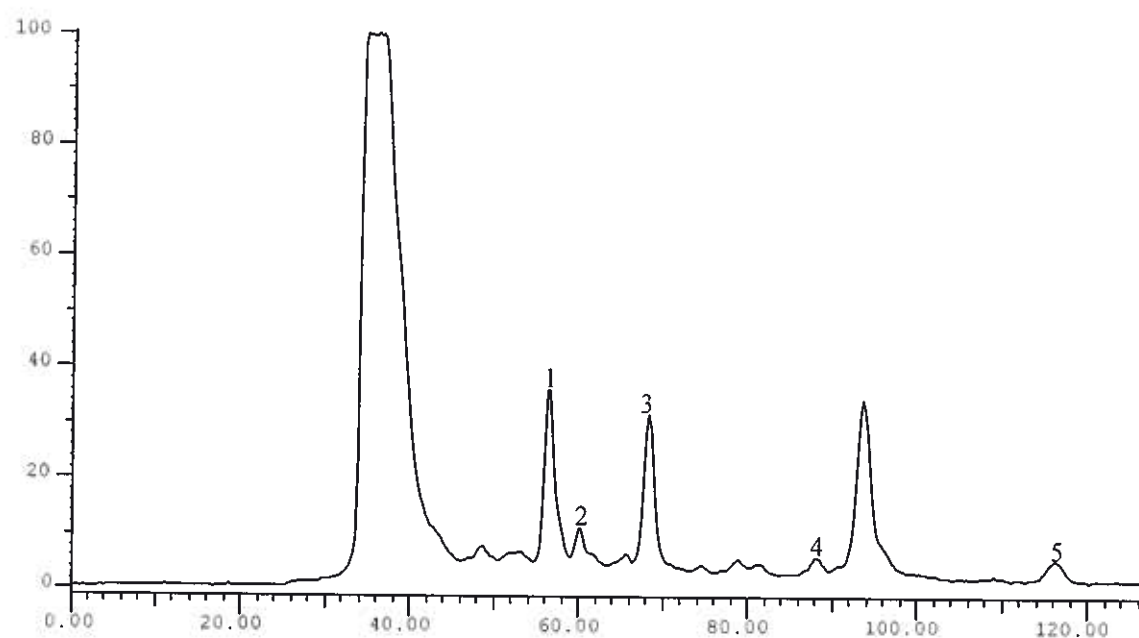
^b Identita látek viz. Obr. 26



Obr. 27: Struktura fenolických látek identifikovaných v zevních listech „tronchuda“ zeli. Identita látek viz Obr. 26.

5.3.2. HPLC ANALÝZA ORGANICKÝCH KYSELIN

V zevních listech zelí se podařilo identifikovat a kvantifikovat pět organických kyselin: kyselinu citrónovou, askorbovou, jablečnou, šikimovou a fumarovou (Obr. 28). Tyto látky jsou popsány v tomto druhu poprvé. Podobně jako u fenolických látek vzorek A obsahoval také nejvíce organických kyselin (cca 55 g/kg) a vzorek C byl na organické kyseliny nejchudší (cca 20 g/kg) (Tab. 11). Ve vzorcích A, B a C byla kyselina jablečná zastoupená v největším množství - tvořící 37 % až 78 % celkových organických kyselin; následovala kyselina citrónová (16–36 %) (Tab. 11). Rozdílný obsah vykazoval vzorek D, ve kterém byla nejhojněji zastoupena kyselina askorbová (44%), následovaná kyselinou jablečnou (39%) (Tab. 11). Ve všech zkoumaných vzorcích byly kyselina šikimová a fumarová nejméně zastoupeny (Tab. 11).



Obr. 28: HPLC chromatogram organických kyselin v zevních listech „trouchuda“ zelí. Detekce při 214 nm. Píky: (1) citrónová kyselina; (2) askorbová kyselina; (3) jablečná kyselina; (4) šikimová kyselina; (5) fumarová kyselina.

Tab. 11: Organické kyseliny v zevních listech „trouchuda“ zelí (mg/kg lyofilizovaného extraktu)^a

Organické kyseliny ^b	Vzorky							
	A		B		C		D	
	Průměrný obsah	SO	Průměrný obsah	SO	Průměrný obsah	SO	Průměrný obsah	SO
1 (RT 56.7 min)	18463.7	52.2	9100.5	171.9	3311.5	184.5	6769.9	3.0
2 (RT 60.1 min)	10609.4	12.1	2937.4	2.8	1028.4	146.3	17342.9	205.6
3 (RT 68.6 min)	20505.8	57.3	13384.7	170.8	15471.7	286.9	15274.3	222.2
4 (RT 88.9 min)	24.1	0.2	17.3	2.0	31.7	1.3	34.0	3.8
5 (RT 116.8 min)	5335.9	115.3	27.7	0.1	111.2	0.0	58.0	1.0
Σ	54938.9		25467.6		19954.4		39479.1	

^a Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří paralelních měření. SO, směrodatná odchylka; Σ, celkové množství stanovených fenolických látek.

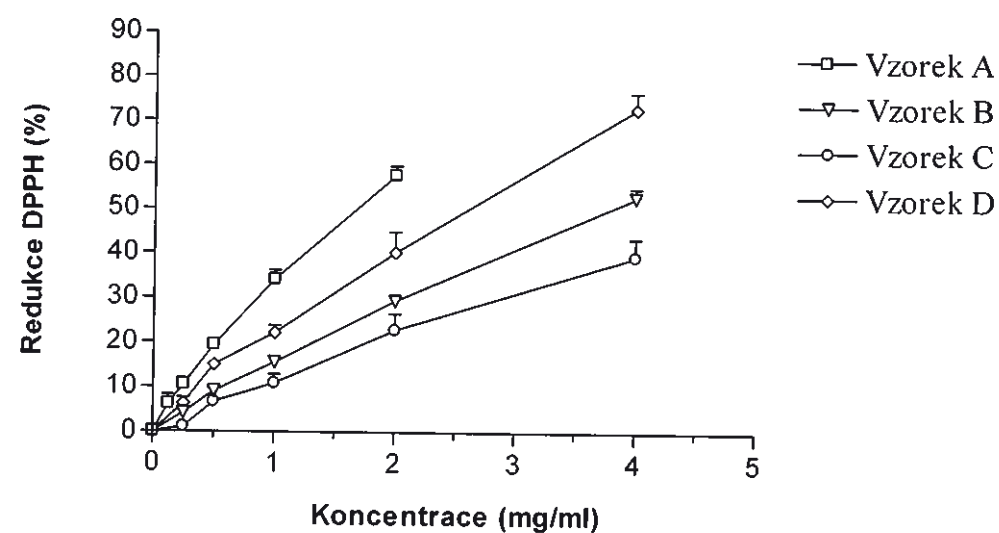
^b Identita látek viz. Obr. 28

5.3.3. ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

Antioxidační kapacita lyofilizovaného vodného extraktu zevních listů zelí je přehledně shrnuta v Tab. 12 a na Obr. 29-32.

5.3.3.1. Aktivita vůči DPPH

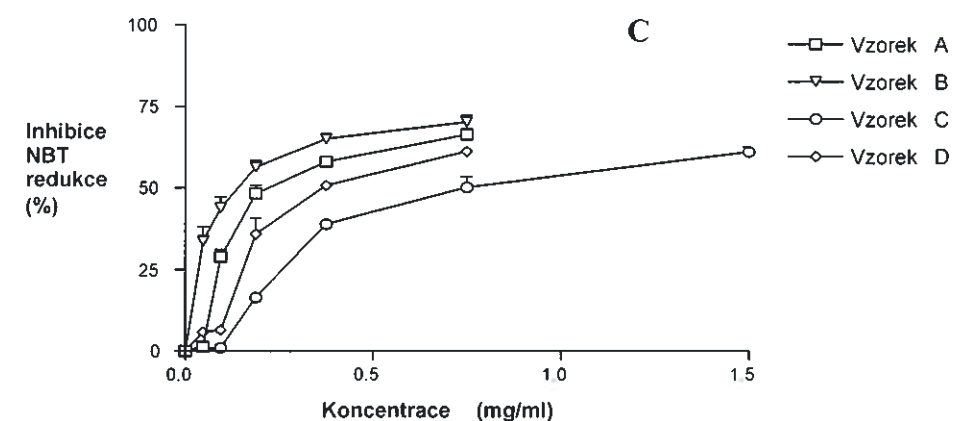
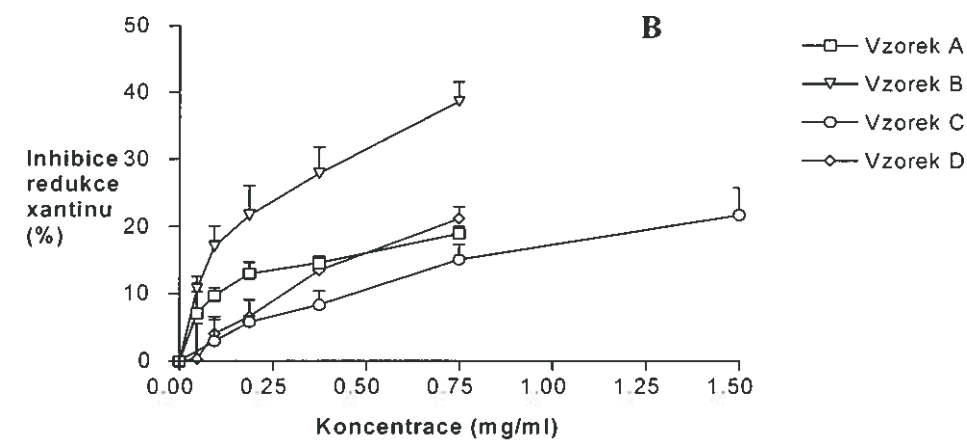
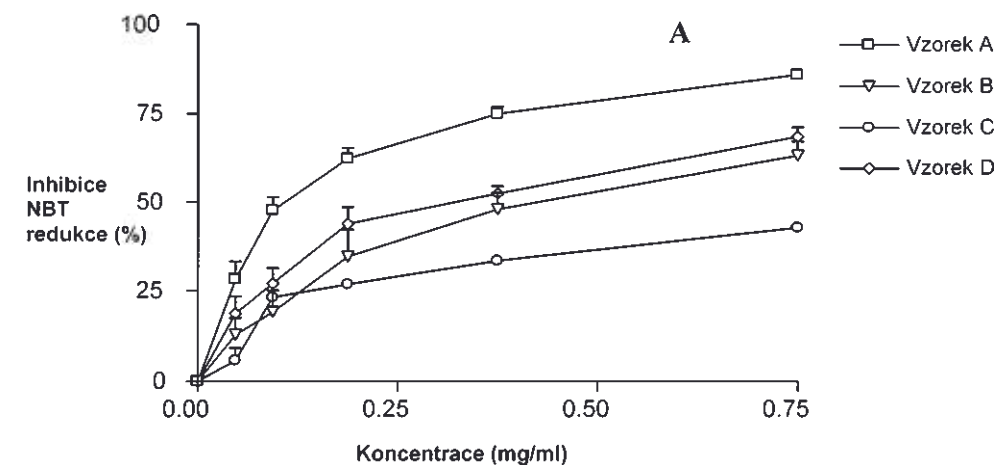
V testu DPPH, který nám podává základní informaci o zhášecí aktivitě extraktu, byl vzorek A nejaktivnější, následován vzorky D a B. Nejnižší naměřenou aktivitu vykazoval vzorek C (Obr. 29 a Tab. 12). Pozorovaný efekt byl závislý na koncentraci extraktu.



Obr. 29: Účinek extraktu ze zevních listů „trouchuda“ zelí na redukci DPPH radikálu. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

5.3.3.2. Aktivita vůči superoxidovému radikálu

Také ve zkoušce se superoxidovým radikálem produkovaným systémem X/XO byl vzorek A nejméně aktivní (Obr. 30A, Tab. 12) a sledovaný efekt byl v závislosti na koncentraci extraktu. Protože inhibice samotného enzymu může také vést ke snížení NBT redukce (42), byl zjišťován také efekt extraktu na aktivitu XO. Kontrolní experiment tedy sledoval vliv extraktu na metabolickou konverzi xantinu na kyselinu močovou. Výsledky ukázaly pouze slabý účinek na XO u vzorků A, C a D, zatímco vzorek B inhiboval enzym ve větší míře ($IC_{20} = 184 \mu\text{g/ml}$) (Obr. 30B), takže u žádného ze vzorků nebylo možné posoudit čistě vliv na superoxidový radikál. Pro potvrzení účinku extraktů byl proveden experiment, kde k produkci superoxidového radikálu slouží neenzymový systém složený z PMS, NADH a kyslíku. Za těchto podmínek všechny vzorky zhasly superoxidový radikál v závislosti na koncentraci (Obr. 30C), přičemž vzorek B vykazoval největší zhasací aktivitu (Tab. 12).

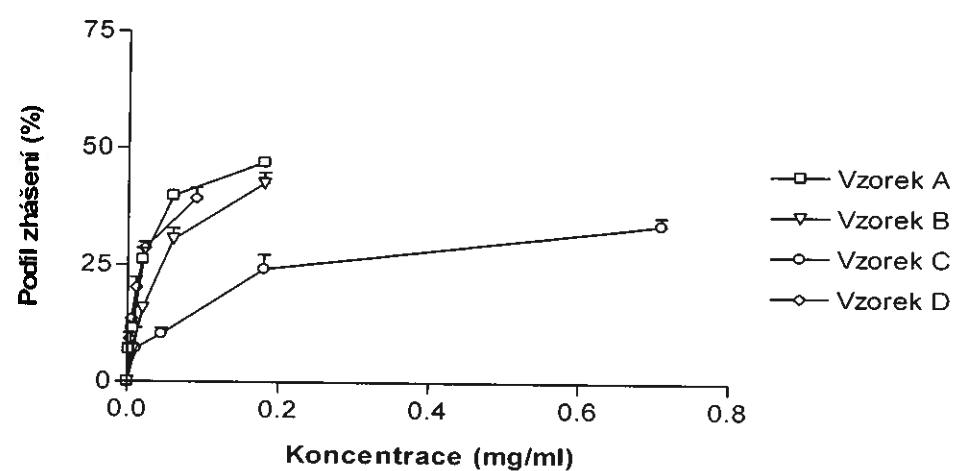


Obr. 30: Účinek extraktu zevních listů „trouchuda“ zelí na: (A) redukci NBT indukovanou superoxidovým radikálem generovaným X/XO systémem; (B) na aktivitu

XO; (C) redukcí NBT indukovanou superoxidovým radikálem generovaným NADH/PMS systémem. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

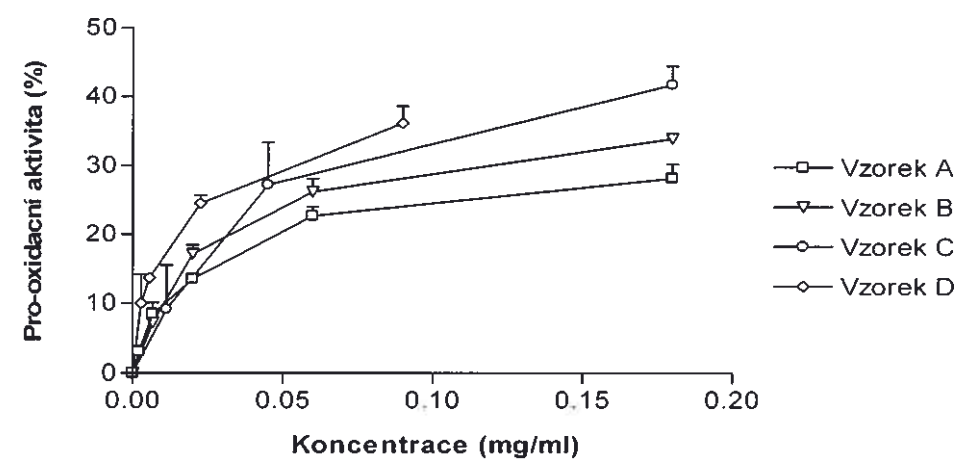
5.3.3.3. Aktivita vůči hydroxylovému radikálu

Všechny vzorky zelí byly aktivní také oproti hydroxylovému radikálu a to v závislosti na koncentraci (Obr. 31), přičemž vzorky A a D vykazovaly nejvyšší aktivitu (Tab. 12). Nejméně aktivní byl i v této zkoušce vzorek C.



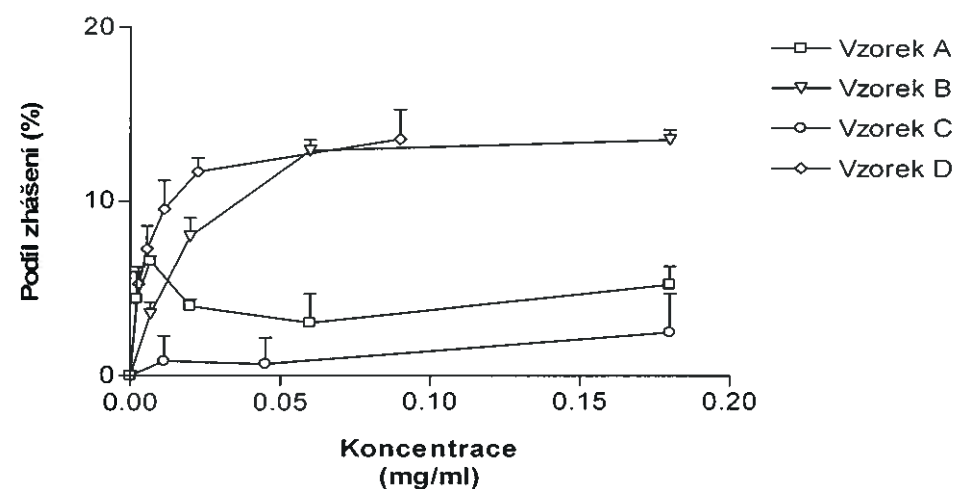
Obr. 31: Nеспецифическая гасящая активность экстракта zevních listů „trouchuda“ zelí vůči hydroxylovému radikálu. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

Ke zjištění pro-oxidačních vlastností extraktu byla provedena zkouška bez kyseliny askorbové. Jak je patrné z Obr. 32, všechny testované vzorky se ukázaly jako vhodná náhrada za kyselinu askorbovou, tedy účinkují jako prooxidanty v závislosti na koncentraci. Prooxidačně nejaktivnější by vzorek D.



Obr. 32: Pro-oxidační aktivita extraktu zevních listů „trouchuda“ zelí ve zkoušce s hydroxylovým radikálem. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

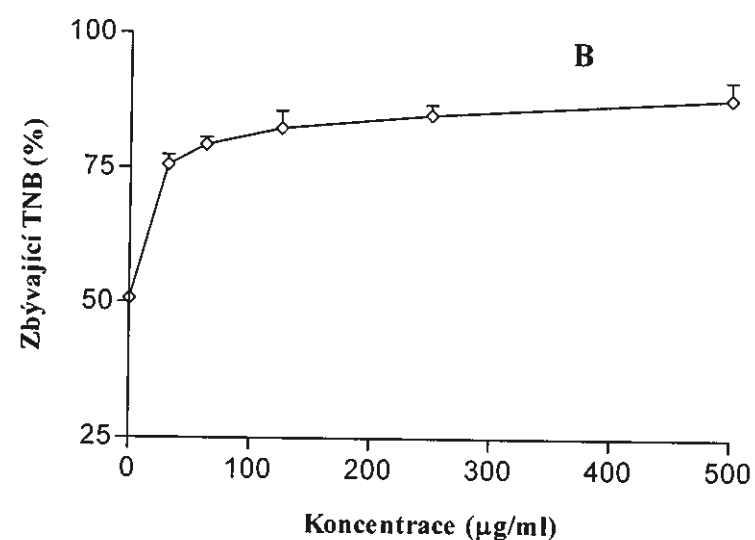
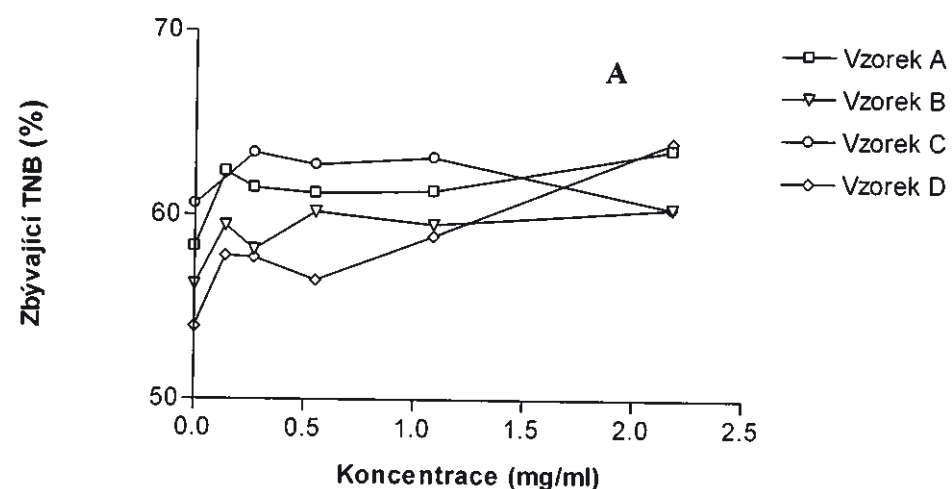
Zkouška provedená bez EDTA ukázala, že extrakty ze vzorků B a D byly do určité míry schopné cheltovat ionty železa v závislosti na koncentraci, zatímco vzorky A a C byly prakticky neúčinné (Obr. 33).



Obr. 33: Specifická гасящая активita (-EDTA) extraktu zevních listů „trouchuda“ zelí vůči hydroxylovému radikálu. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

5.3.3.4. Aktivita vůči kyselině chlorné

Vzorky zelí byly testovány také oproti kyselině chlorné. S výjimkou vzorku D, který projevil určitou, na koncentraci závislou aktivitu, nebyly zaznamenány téměř žádné protektivní účinky vzorků (Obr. 34A). Za stejných podmínek byl odzkoušen i standard - lipoová kyselina, která zabraňovala konverzi TNB na DTNB z 83 % v koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 34B).



Obr. 34: Účinek extraktu z vnějších listů „trouchuda“ zelí (A) a kyseliny lipoové (B) na oxidaci TNB indukovanou kyselinou chlornou. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

Porovnáním výsledků testů se ukázalo že nejvyšší antioxidační aktivitu prokázal vzorek A. Toto zjištění není překvapující pokud vezmeme v úvahu jeho, v porovnání s ostatními vzorky, vysoký obsah fenolických látek a organických kyselin (Tab. 10 a 11), které jsou známé pro svou antioxidační aktivitu (166). Navíc vzorek A obsahoval velké množství acylovaných flavonolů, zejména deriváty kyseliny kávové (Tab. 10). Tyto látky jsou známé pro svou vysokou zhášecí schopnost danou přítomností *o*-dihydroxy seskupení v molekule kyseliny kávové, které přispívá ke stabilitě její radikálové formy a podílí se na elektronové delokalizaci (167). Vysoký obsah derivátů kyseliny kávové může také přispívat ke sledovanému nižšímu pro-oxidačnímu efektu díky přítomnosti katecholového kruhu (168). Nejnižší aktivita byla pozorována u vzorku C, což odpovídá velmi nízkému obsahu fenolických látek a nižšímu obsahu organických kyselin. Navíc tento vzorek obsahoval v porovnání s ostatními nejméně kyseliny askorbové. Překvapivě ovšem vykazoval vysokou pro-oxidační aktivitu ve zkoušce s hydroxylovým radikálem, pro-oxidační aktivita je tedy zřejmě dána přítomností jiných látek v extraktu než kyselinou askorbovou. Významná antioxidační aktivita byla také nalezena u vzorku D, což může souviset s jeho vysokým obsahem kyseliny askorbové. Na druhou stranu byla pozorována i značná pro-oxidační aktivita ve zkoušce s deoxyribózou bez kyseliny askorbové. I toto zjištění lze dát do souvislosti s vysokým obsahem kyseliny askorbové.

Ačkoliv antiradikálová aktivita fenolických látek, stejně tak jako organických kyselin je dobře známá, není jasné jak oproti reaktivním formám kyslíku působí komplexní směs látek získaná extrakcí z rostliny. Očekávaná aktivita může být v takové směsi jak zvýrazněná komplexem látek, ale i potlačena. Také u vzorků zelí zjištěná antioxidační kapacita lyofilizovaných vodných extraktů příliš nekorelovala s obsahem fenolických látek a organických kyselin.

Pokud shrneme výsledky získané ve zkouškách na antioxidační aktivitu a srovnáme je s obsahem fenolických látek a organických kyselin ve vodném extraktu ze zevních listů zelí, je zhášecí aktivita oproti DPPH, superoxidovému radikálu, hydroxylovému radikálu a kyselině chlorné dána přítomností právě těchto látek obsažených ve značném množství. Poznatky o antioxidační aktivitě variety zelí „trouchuda“ nebyly dosud známy. Zevní listy „trouchuda“ zelí mohou být vhodným

zdrojem antioxidantů v naší stravě, což by mohlo být důležité v prevenci chorob, způsobených činností volných radikálů.

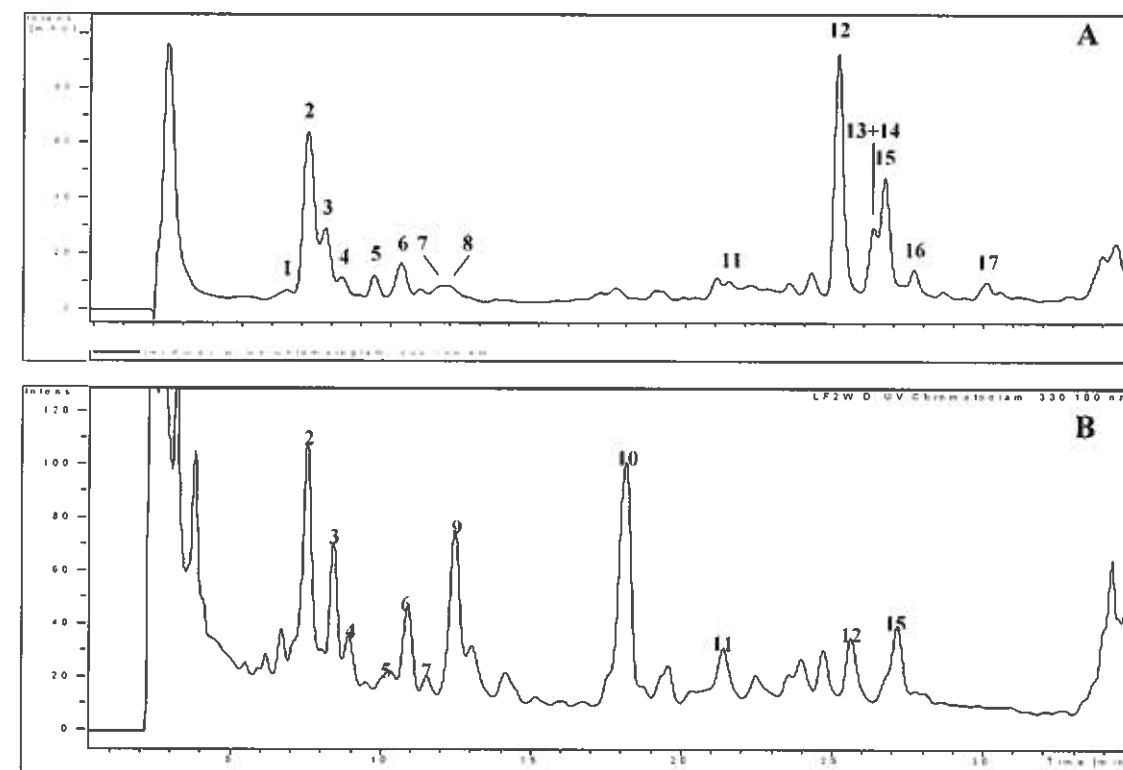
Tab. 12: IC₂₅ hodnoty (mg ml⁻¹) zevních listů "tronchuda" zelí v antiradikálových zkouškách

Vzorky	DPPH	O ₂ ^{•-} (generovaný neenzymaticky)	O ₂ ^{•-} (generovaný enzymaticky)	OH [•]
	IC ₂₅	IC ₂₅	IC ₂₅	IC ₂₅
A	0.681	0.102	0.047	0.019
B	1.663	0.045	0.139	0.045
C	2.322	0.362	0.311	0.223
D	1.136	0.146	0.101	0.018

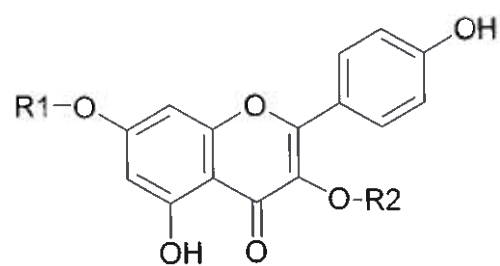
5.4. BRASSICA OLERACEA var. COSTATA - vnitřní listy

5.4.1. HPLC ANALÝZA FENOLICKÝCH LÁTEK

Fenolické látky byly v lyofilizovaném vodném extraktu z vnitřních listů zelí kvantifikovány na základě HPLC/DAD analýzy a výsledky shrnuje Tab. 13. Získaný chromatogram je na Obr. 35B. Byl nalezen vysoký obsah fenolických látek (cca 1.4 g/kg sušiny) (Tab. 13), kde hlavní složkou byl kempferol 3-*O*-soforosid-7-*O*-glukosid (3) (cca 21% z celkových identifikovaných látek), následovala kyselina 3-*p*-kumaroylchinová (2) (cca 14% z celkových fenolů). 1,2'-Disinapoyl-2-feruloylgentiobióza (16) byla přítomna v nejmenším množství (cca 1% z celkových identifikovaných látek). Kyselina sinapová (10), která byla detekována v extraktu metanol-voda pouze ve velmi malém množství, představovala celých 13 % z identifikovaných fenolů ve vodném extraktu zelí. Přítomnost velkého množství kyseliny sinapové a 4-*p*-kumaroylchinové kyseliny (9) ve vodném extraktu je dána zřejmě vysokou rozpustností těchto látek ve vroucí vodě. Rozdíly v chromatogramech metanolového (Obr. 35A) a vodného (Obr. 35B) extraktu lze vysvětlit rozkladem derivátů kyseliny sinapové. Struktury základních molekul od kterých jsou odvozeny fenolické látky v extraktu zelí jsou znázorněny na Obr. 36.

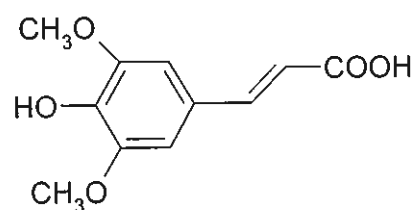


Obr. 35: HPLC-DAD chromatogram fenolických látek vnitřních listů "tronchuda" zelí (A) extrakt voda - metanol (B) vodný extrakt za horka. Detekce při 330 nm. Píky: (1) kvercetin 3-*O*-soforosid-7-*O*-glukosid; (2) 3-*p*-kumaroylchinová kyselina; (3) kempferol 3-*O*-soforosid-7-*O*-glukosid; (4) kempferol 3-*O*-(kaffeoyl)-soforosid-7-*O*-glukosid; (5) glukosid kyseliny sinapové; (6) kempferol 3-*O*-(sinapoyl)-soforosid-7-*O*-glukosid; (7) kempferol 3-*O*-(feruloyl)-soforosid-7-*O*-glukosid; (8) kempferol 3-*O*-(*p*-kumaroyl)-soforosid-7-*O*-glukosid; (9) 4-*p*-kumaroylchinová kyselina; (10) sinapová kyselina; (11) kempferol 3-*O*-soforosid; (12) 1,2-disinapoylgentiobióza; (13) 1-sinapoyl-2-feruloylgentiobióza; (14) izomer 1,2-disinapoylgentiobiózy; (15) 1,2,2'-trisinapoylgentiobióza; (16) 1,2'-disinapoyl-2-feruloylgentiobióza; (17) izomer 1,2-disinapoylgentiobiózy

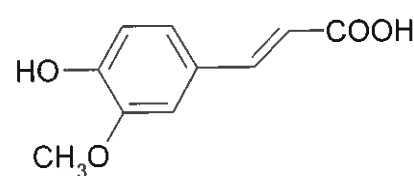


deriváty kempferolu

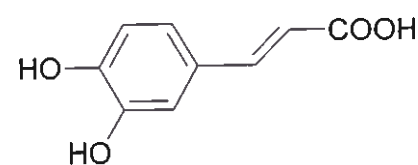
R1 = cukerný zbytek
R2 = cukerný zbytek, zbytek od kyseliny sinapové,
kávnové, ferulové, chinové



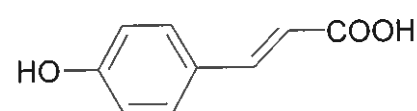
kyselina sinapová



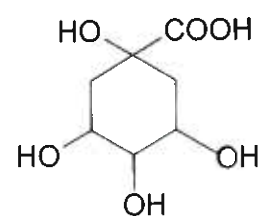
kyselina ferulová



kyselina kávová



kyselina p-kumarová



kyselina chinová

Obr. 36: Struktura základních molekul od kterých jsou odvozeny fenolické látky
v extraktu „tronchuda“ zelí

Tab. 13: Fenolické látky ve vodném extraktu vnitřních listů zelí (mg/kg lyofilizovaného
extraktu)^a

	Fenolické látky	Průměrný obsah (mg/kg)	SO
1	Kvercetin 3- <i>O</i> -soforosid-7- <i>O</i> -glykosid	nd	
2	3- <i>p</i> -kumaroylchinová kyselina	189.0	1.4
3	Kempferol 3- <i>O</i> -soforosid-7- <i>O</i> -glykosid	287.8	8.8
4	Kempferol 3-(kaffeoyl)-soforosid-7- <i>O</i> -glykosid	120.5	3.7
5	Glykosid kyseliny sinapové	25.7	0.2
6	Kempferol 3-(sinapoyl)-soforosid-7- <i>O</i> -glykosid	180.7	5.5
7	Kempferol 3-(feruloyl)-soforosid-7- <i>O</i> -glykosid	53.6	1.6
8	Kempferol 3-(<i>p</i> -kumaroyl)-soforosid-7- <i>O</i> -glykosid	nd	
9	4- <i>p</i> -kumaroylchinová kyselina	126.0	0.9
10	Sinapová kyselina	180.1	1.1
11	Kempferol 3- <i>O</i> -soforosid	100.4	3.1
12	1,2-disinapoylgentiobiosid	51.5	0.3
13	1-sinapoyl-2-feruloylgentiobióza	nd	
14	Izomero 1,2-disinapoylgentiobiosid	nd	
15	1,2,2'-trisinapoylgentiobióza	62.9	0.4
16	1-2'-disinapoyl-2-feruloylgentiobióza	11.4	0.1
17	Izomero 1,2-disinapoylgentiobiosid	nd	
	Σ	1389.6	

^a Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří paralelních měření. SO, směrodatná odchylka; Σ, celkové množství stanovovaných fenolických látek, nd – nedetekováno.

Tab. 14: Fenolické látky ve vodném extraktu zevních listů zelí (mg/kg lyofilizovaného extraktu)^a

Fenolické látky		Průměrný obsah (mg/kg)	SO
2	3- <i>p</i> -kumaroylchinová kyselina	481.8	8.6
3	3- <i>O</i> -soforosid-7- <i>O</i> -glykosid	852.2	14.0
11	kempferol 3- <i>O</i> -soforosid	797.4	31.4
18 + 19	kempferol 3- <i>O</i> -soforotriosid-7- <i>O</i> -glykosid + kempferol 3- <i>O</i> -(metoxykaffeoyl/kaffeoyl)-soforosid-7- <i>O</i> -glykosid	452.6	12.3
20	kempferol 3- <i>O</i> -soforotriosid-7- <i>O</i> -soforosid	445.3	6.1
21	kempferol 3- <i>O</i> -soforosid-7- <i>O</i> -soforosid	2788.4	48.9
22	kempferol 3- <i>O</i> -(sinapoyl/kaffeoyl)-soforosid-7- <i>O</i> -glykosid	1682.0	21.2
23	kempferol 3- <i>O</i> -(feruloyl/kaffeoyl)-soforosid-7- <i>O</i> -glykosid	1886.0	45.1
24	kempferol 3- <i>O</i> -soforotriosid	718.9	7.2
25	kempferol 3- <i>O</i> -(sinapoyl)-soforosid	1244.0	62.8
26 + 27	kempferol 3- <i>O</i> -(feruloyl)-soforotriosid + kempferol 3- <i>O</i> -(feruloyl)-soforosid	1988.8	33.1
28	kempferol 3- <i>O</i> -glykosid	neměřitelné	-
	Σ	13337.4	

^a Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří paralelních měření. SO, směrodatná odchylka; Σ, celkové množství stanovovaných fenolických látek.

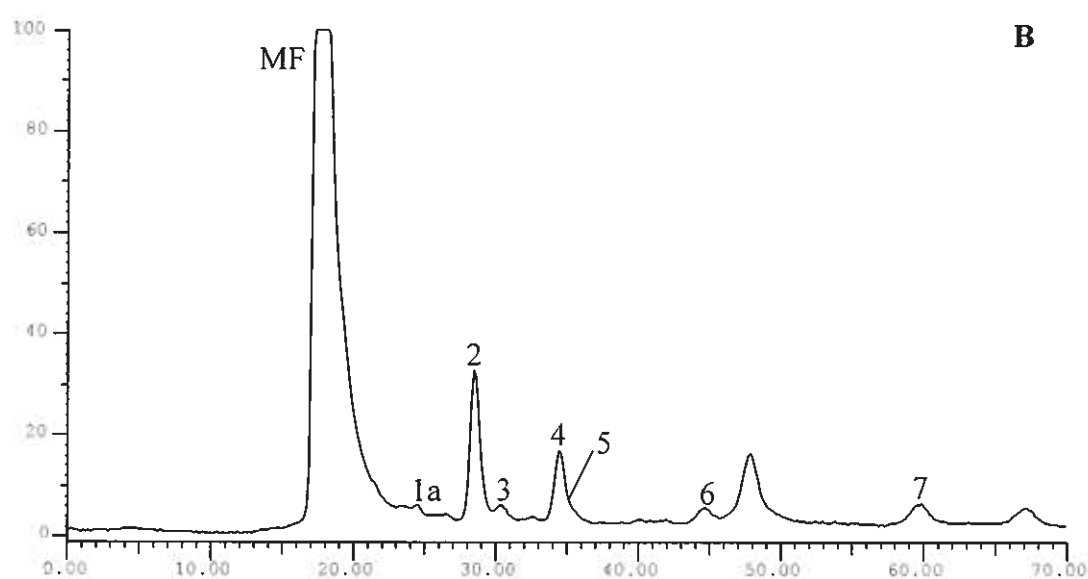
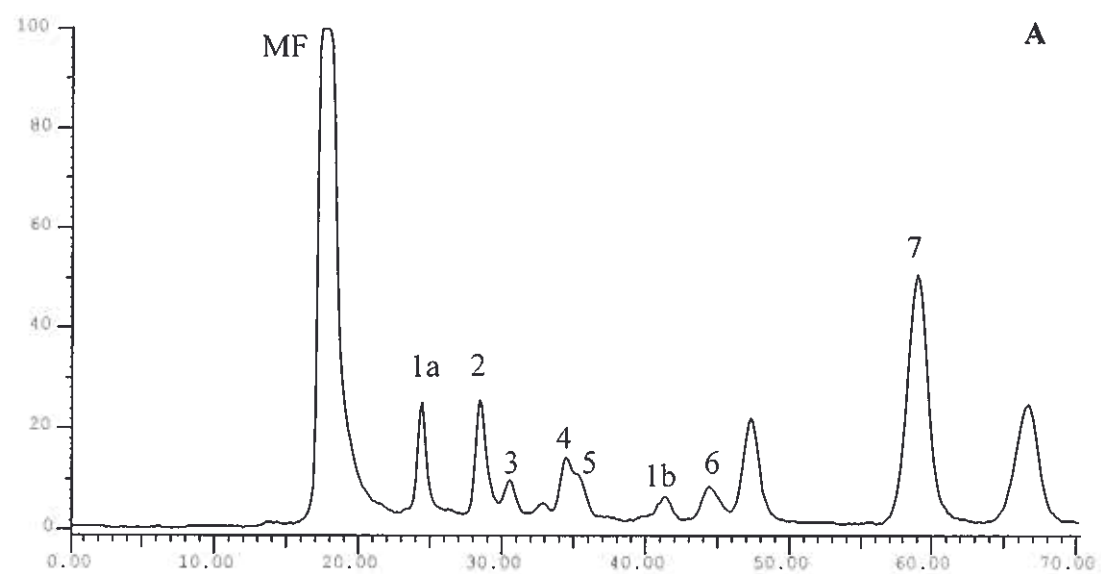
5.4.2. HPLC ANALÝZA ORGANICKÝCH KYSELIN

Ve vodném extraktu z vnitřních listů zelí se podařilo identifikovat a kvantifikovat 7 organických kyselin: akonitová, citrónová, askorbová, jablečná, chinová, šikimová a fumarová (Obr. 37). Tyto organické kyseliny jsou popsány poprvé v tomto druhu. Ani jeden ze vzorků neobsahoval kyselinu šťavelovou, ketoglutarovou, jantarovou, mléčnou, octovou, pyrohroznovou, jablečnou a vinnou. V extraktu byl nalezen vysoký obsah organických kyselin (cca 23 g/kg), ze kterých převládala kyselina citrónová, tvořící cca 43 % celkových organických kyselin, následovaly kyselina jablečná a chinová (cca 28 % celkových kyselin) (Tab. 15). Nejméně zastoupená byla kyselina šikimová, která byla přítomná v extraktu pouze v množství 0.2 % z celkových kyselin (Tab. 15).

Tab. 15: Organické látky ve vodném extraktu „trouchuda“ zelí (v mg/kg lyofilizovaného výluhu)^a

Organické kyseliny	Vnitřní listy		Zevní listy		
	Průměrný obsah	SO	Průměrný obsah	SO	
1	Akonitová	191.1	3.7	21.7	8.2
2	Citrónová	9974.6	68.2	8130.7	421.2
3	Askorbová	6020.1	143.4	8754.1	517.4
4 + 5	Jablečná + Chinová	6626.4	164.8	8604.7	974.6
6	Šikimová	35.0	1.0	19.7	0.5
7	Fumarová	407.6	1.8	14.2	0.1
	Σ	23254.8		25545.1	

^a Výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří paralelních měření. SO, směrodatná odchylka; Σ, celkové množství stanovovaných fenolických látek.

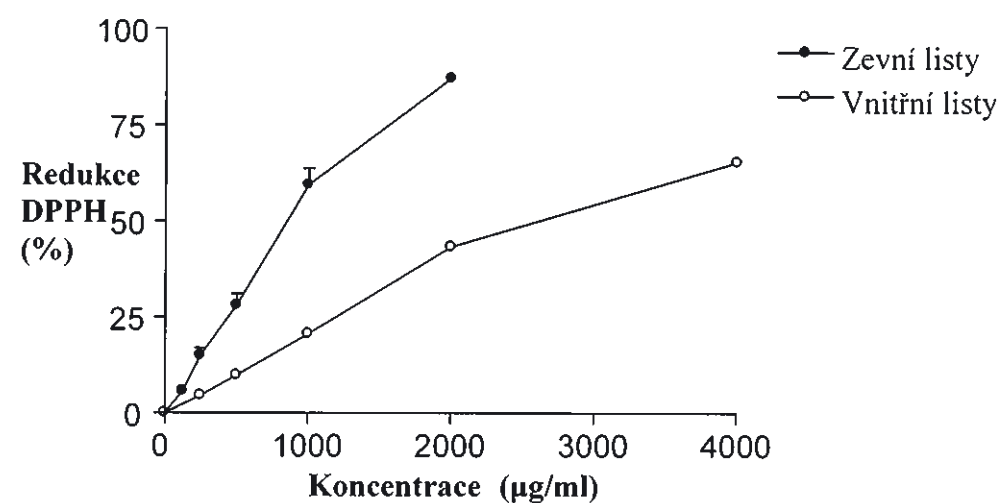


Obr. 37: HPLC-UV chromatogram organických kyselin ve vodném extraktu za horka z (A) vnitřních a (B) zevních listů „trouchuda“ zelí. Detekce při 214 nm. Píky: (MF) mobilní fáze; (1a a 1b) izomery kyseliny akonitové; (2) citrónová kyselina; (3) askorbová kyselina; (4) jablečná kyselina; (5) chinová kyselina; (6) šikimová kyselina; (7) fumarová kyselina.

5.4.3. ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

5.4.3.1. Aktivita vůči DPPH

Extrakt z vnitřních listů zelí byl aktivní oproti DPPH radikálu a to v závislosti na koncentraci ($IC_{25} = 1192 \mu\text{g/ml}$), ačkoliv v porovnání s výluhem ze zevních listů šlo o nižší aktivitu ($IC_{25} = 440 \mu\text{g/ml}$) (Obr. 38).



Obr. 38: Účinek extraktu „trouchuda“ zelí na redukci DPPH radikálu. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

5.4.3.2. Aktivita vůči superoxidovému radikálu

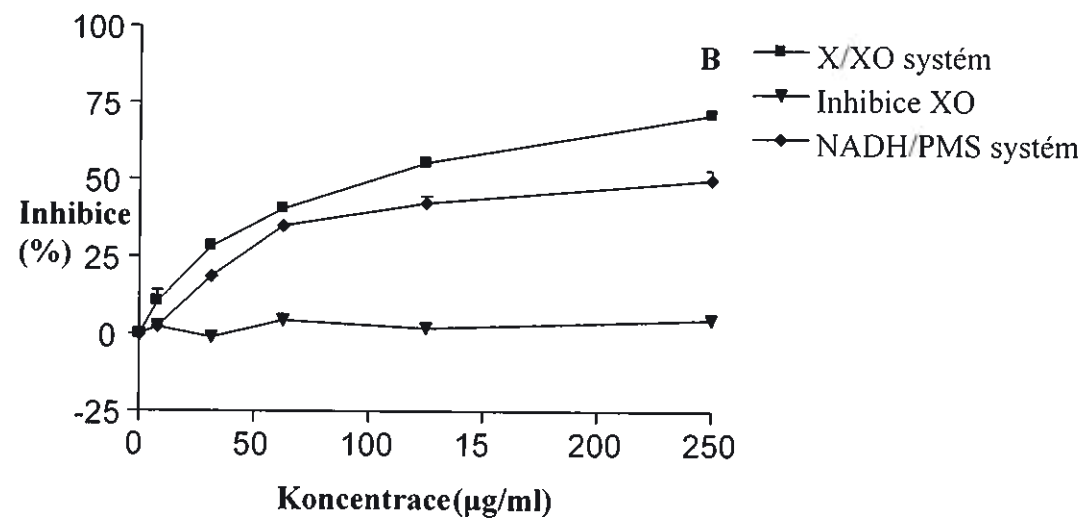
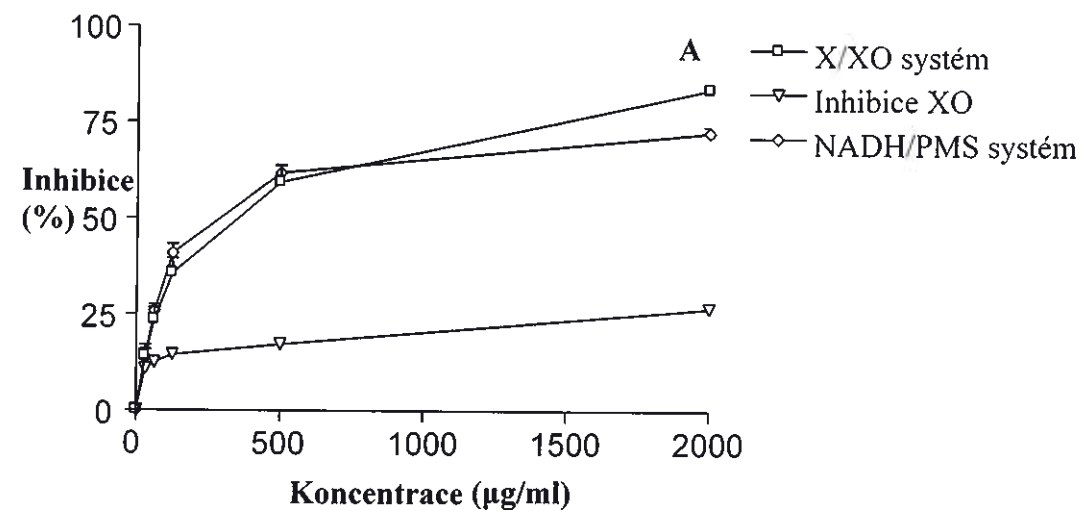
5.4.3.2.1. Superoxid generovaný enzymaticky

Extrakt také v závislosti na koncentraci zhasel superoxidový radikál generovaný systémem X/XO (Obr. 39A) s hodnotou $IC_{50} = 351 \mu\text{g/ml}$. Srovnáme-li jeho aktivitu s extraktem ze zevních listů ($IC_{50} = 102 \mu\text{g/ml}$) je aktivita extraktu z vnitřních listů nižší (Obr. 39B). Zjišťován byl také vliv obou extraktů na aktivitu xantinoxidázy, přičemž vnitřní listy prokázaly určitý inhibiční účinek oproti XO, který byl závislý na koncentraci ($IC_{10} = 273 \mu\text{g/ml}$) (Obr. 39A); zatímco pro zevní listy žádný účinek na enzym nebyl pozorován (Obr. 39B).

5.4.3.2.2. Superoxid generovaný neenzymaticky

Schopnost zhaset superoxidový radikál byla pro oba lyofilizované extrakty potvrzena zkouškou se superoxidovým radikálem, generovaným chemickým systémem, tvořeným PMS, NADH a kyslíkem. V této zkoušce se vnitřní listy ukázaly být slabším zhasěčem

superoxidového radikálu ($IC_{25} = 101 \mu\text{g/ml}$) (Obr. 39A) než listy zevní ($IC_{25} = 43 \mu\text{g/ml}$) (Obr. 39B). Ze získaných výsledků vyplývá, že na antioxidační aktivitě extraktu z vnitřních listů se v enzymové zkoušce se podílela jak jeho zhašecí aktivita vůči radikálu, tak inhibice enzymu.



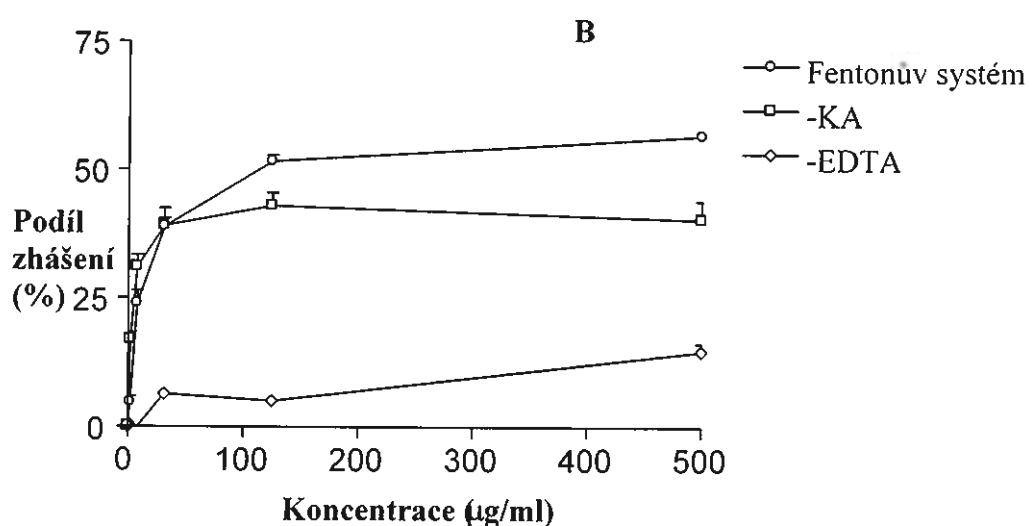
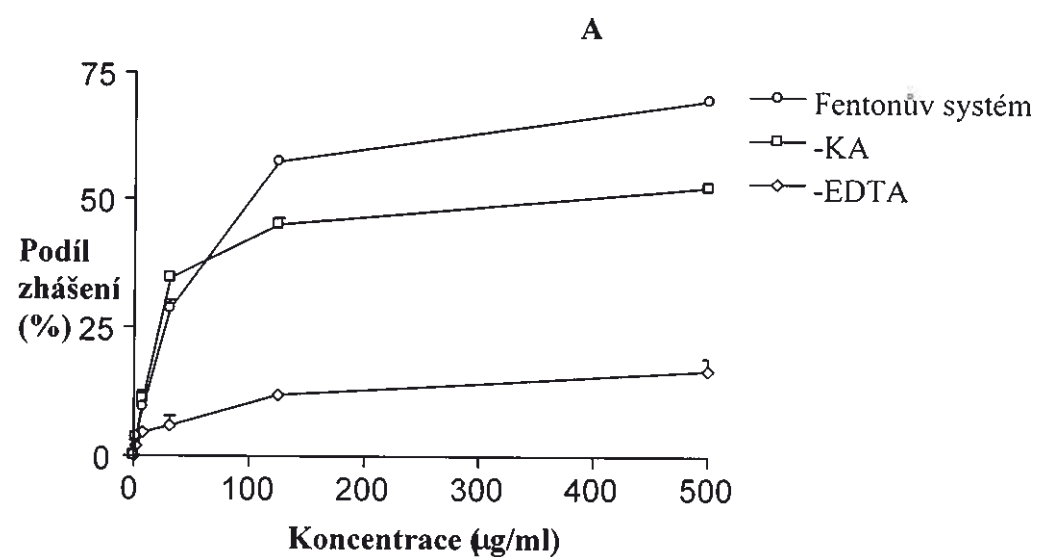
Obr. 39: Účinek "trouchuda" zelí (A) vnitřních a (B) zevních listů oproti superoxidovému radikálu generovanému enzymaticky, neenzymaticky a ovlivnění aktivity XO. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

5.4.3.3. Aktivita vůči hydroxylovému radikálu

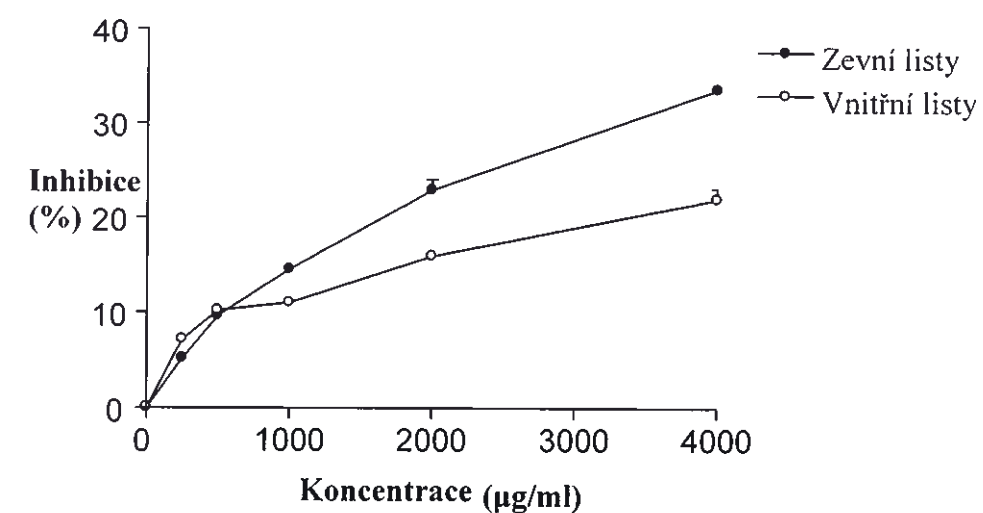
Extrakt z vnitřních listů zelí měl také značnou aktivitu ve zkoušce s hydroxylovým radikálem a to v závislosti na koncentraci (Obr. 40A), s hodnotou $IC_{25} = 27 \mu\text{g/ml}$. Ačkoliv, v porovnání s extraktem ze zevních listů, byl sledovaný účinek menší ($IC_{25} = 10 \mu\text{g/ml}$) (Obr. 40B). Experiment byl proveden také bez kyseliny askorbové (KA) s cílem zjistit pro-oxidační účinky extraktů. Ani jeden z extraktů nevykázal významnou pro-oxidační aktivitu (Obr. 40). Ke zjištění schopnosti extraktů chelátovat ionty železa, byla Fentonova reakce provedena také bez chelatačního činidla - EDTA. Oba lyofilizované extrakty za těchto podmínek vykázaly slabou schopnost chelátovat ionty železa (Obr. 40).

5.4.3.4. Aktivita vůči kyselině chlorné

Jak je vidět z Obr. 41, vnitřní listy zelí prokázaly slabou aktivitu vůči kyselině chlorné, která byla závislá na koncentraci. Účinnější byl opět extrakt ze zevních listů, jak je patrné rovněž z Obr. 41.



Obr. 40: Účinek extraktu z (A) vnitřních listů a (B) zevních listů „trachuda“ zeli: nespecifická zhášecí aktivita vůči hydroxylovému radikálu (Fentonův systém); prooxidační aktivita (- KA) a specifická zhášecí aktivita vůči hydroxylovému radikálu (- EDTA). Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.



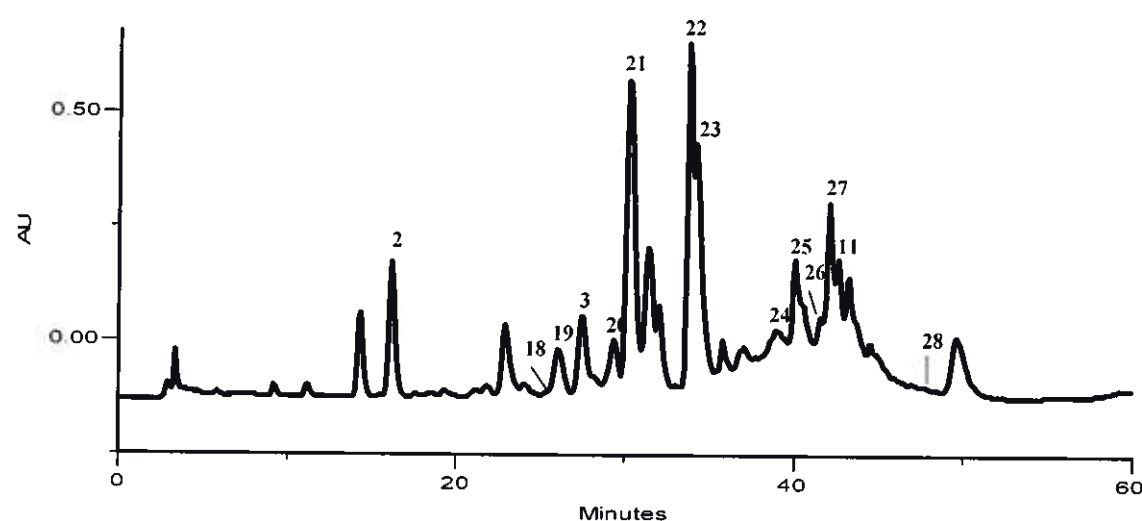
Obr. 41: Účinek extraktu „trachuda“ zeli na oxidaci TNB způsobenou kyselinou chlornou. Uvedené hodnoty jsou průměrem ze 3 měření provedených třikrát.

Získané výsledky ze zkoušek na antioxidační aktivitu nám ukazují jednoznačně vyšší antioxidační potenciál u extraktu ze zevních listů zeli. Tato skutečnost je zřejmě dána vyšším obsahem jak fenolických látek tak organických kyselin v extraktu ze zevních listů (Tab. 14 a 15), které mají prokazatelné antioxidační účinky (166).

Různý je nejen obsah fenolických látek v obou extraktech, ale také jejich kvalitativní složení: v zevních listech bylo, s výjimkou 3-*p*-kumaroylchinové kyseliny (2), kempferol 3-*O*-soforosid-7-*O*-glukosidu (3) a kempferol 3-*O*-soforosidu (11), identifikováno mnoho fenolických látek, zejména flavonolových glykosidů (Obr. 42), které byly odlišné od flavonolových glykosidů nalezených v extraktu z vnitřních listů (Obr. 35). Antioxidační aktivita byla již dříve popsána jak pro flavonolové glykosidy (167,169) tak i pro hydroxyskořicové kyseliny (170). Zřejmě nejvyšší podíl na sledované antioxidační aktivitě mají flavonolové glykosidy, neboť jejich obsah byl v zevních listech značně vyšší než v listech vnitřních (95 a 54 % z celkových fenolických látek). Také vyšší množství acylovaných flavonolů, jmenovitě derivátů kyseliny kávové, může vysvětlovat vyšší antioxidační účinek zevních listů (Tab. 14). Tyto látky jsou známé svojí vysokou zhášecí schopností danou přítomností *o*-dihydroxy seskupení ve zbytku kyseliny kávové, které přispívá ke stabilitě jejich radikálové formy a podílí se na elektronové delokalizaci (167). Co se týká organických kyselin, oba extrakty obsahovaly stejné organické kyseliny (Obr. 37), nicméně v různém množství (Tab. 15), což mohlo ovlivnit sledovanou antioxidační

aktivitu. Hlavní organickou kyselinou ve vnitřních listech byla kyselina citrónová, 43 % z celkových identifikovaných kyselin, následována dvojicí kyselin – kyselina jablečná a chinová (kvantifikovány společně - 28 %), zatímco v zevních listech byla nejvíce zastoupena kyselina askorbová a dále kyselina jablečná a kyselina chinová (34 %, každá). Z vyšší aktivity zevních listů lze usuzovat, že kyselina citrónová by mohla hrát důležitou roli v antioxidační aktivitě zelí. Je známo, že kyselina citrónová má schopnost chránit kyselinu askorbovou před oxidací katalyzovanou kovy a funguje také jako synergista s jinými antioxidanty (166).

Vnitřní listy zelí tedy představují dobrý zdroj zdraví prospěšných látek, zejména flavonoidů a organických kyselin, což by mohlo být užitečné v prevenci chorob podmíněných účinkem volných radikálů.



Obr. 42: HPLC-DAD chromatogram fenolických látek extraktu v horké vodě ze zevních listů "trouchuda" zelí. Detekce při 330 nm. Píky: (2) 3-*p*-kumaroylchinová kyselina; (3) kaempferol 3-*O*-soforosid-7-*O*-glukosid; (11) kaempferol 3-*O*-soforosid; (18) kaempferol 3-*O*-soforotriosid-7-*O*-glukosid; (19) kaempferol 3-*O*-(metoxykaffeoyl/kaffeoyl)-soforosid-7-*O*-glukosid; (20) kaempferol 3-*O*-soforotriosid-7-*O*-soforosid; (21) kaempferol 3-*O*-soforosid-7-*O*-soforosid; (22) kaempferol 3-*O*-(sinapoyl/kaffeoyl)-soforosid-7-*O*-glukosid; (23) kaempferol 3-*O*-(feruloyl/kaffeoyl)-soforosid-7-*O*-glukosid; (24) kaempferol 3-*O*-soforotriosid; (25) kaempferol 3-*O*-(sinapoyl)-soforosid; (26) kaempferol 3-*O*-(feruloyl)-soforotriosid; (27); kaempferol 3-*O*-(feruloyl)-soforosid; (28) kaempferol 3-*O*-glukosid.

6. ZÁVĚR

- Z dostupných zdrojů byl vypracován přehled metod *in vitro* stanovení antioxidační aktivity přírodních látek se zaměřením na fenolické látky - flavonoidy a fenolické kyseliny. Tento přehled je součástí teoretické části této disertační práce.
- na základě HPLC/DAD analýzy lyofilizovaného nálevu z *Ballota nigra*, *Linaria vulgaris* a lyofilizovaných vodných extraktů vnitřních a zevních listů *Brassica oleracea* var. *costata* D.C. byla provedena identifikace a stanovení obsahu fenolických látek. Identifikace fenolických látek z *Brassica oleracea* var. *costata* D.C. proběhla na základě předchozí HPLC-DAD-MS/MS-ESI analýzy (126,130).
- organické kyseliny byly identifikovány a kvantifikovány ve výše zmíněných vzorcích s využitím HPLC/UV analýzy.
- vzorky byly dále testovány na antioxidační aktivitu a to oproti radikálu DPPH a reaktivním formám kyslíku (superoxidovému, hydroxylovému radikálu a kyselině chlorné). Účinek nálevu z *Ballota nigra* a *Linaria vulgaris* byl také zkoušen oproti oxidu dusnatému.

Ballota nigra

- Bylo identifikováno a kvantifikováno 7 fenolických látek (kyselina chlorogenová, kávová, kaffeoyljablečná, ballotetriosid, forsythosid B, verbaskosid a allysonosid) a 8 organických kyselin (šťavelová, akonitová, citrónová, askorbová, jablečná, chinová, šikimová a fumarová kyselina). Forsythosid B a kyselina chinová byly látkami obsaženými v největším množství. Nálev *B. nigra* prokázal značnou antioxidační aktivitu, uvažujeme-li jeho účinky oproti superoxidovému radikálu, DPPH^{*} a oxidu dusnatému.

Ve zkoušce s hydroxylovým radikálem byla zaznamenána značná pro-oxidační aktivita.

Linaria vulgaris

- Analýza fenolických látek v *L. vulgaris* odhalila přítomnost čtyř látek, ze kterých se podařilo identifikovat pouze linarin. V nálevu bylo identifikováno a kvantifikováno 8 organických kyselin (šřavelová, akonitová, citrónová, ketoglutarová, askorbová, jablečná, šikimová a fumarová), přičemž kyselina askorbová byla převládající látkou v množství cca 23.5 g/kg. Nálev *L. vulgaris* byl velmi dobrým zhášečem DPPH a oxidu dusnatého, také účinek oproti superoxidovému radikálu byl významný. Ve zkoušce s hydroxylovým radikálem byla zaznamenána značná pro-oxidační aktivita zejména v koncentracích vyšších než 31.25 µg/ml. Nálev *L. vulgaris* nebyl aktivní oproti kyselině chlorné.

***Brassica oleracea var. costata* D.C.**

Zevní listy

- byly testovány 4 vzorky lišící se dobou sběru (listopad a prosinec 2002) a typem kultivace (organická či tradiční).
- ve vodném extraktu zevních listů bylo identifikováno a kvantifikováno 13 fenolických látek (derivátů kempferolu) a 5 organických kyselin. Nejvyšší obsah fenolických látek i organických kyselin měl vzorek z listů rostlin, pěstovaných organicky a sbíraných v listopadu (vzorek A).
- Extrakty byly účinné oproti všem sledovaným radikálům, ačkoliv byl zaznamenán také určitý pro-oxidační efekt. Nejvyšší antioxidační aktivitu prokázal vzorek A.

Vnitřní listy

- Pro analýzu vnitřních listů byly použity vzorky zelí sbírané v říjnu 2004 a pěstované organicky.

- Ve vodném extraktu z vnitřních listů bylo identifikováno a kvantifikováno 17 fenolických látek a 7 organických kyselin.
- Extrakt byly aktivní oproti všem sledovaným radikálům v závislosti na koncentraci. Zjištěná antioxidační aktivita byla porovnána s antioxidační aktivitou extraktu ze zevních listů, jejichž analýza proběhla současně s analýzou vnitřních listů. Byl prokázán jednoznačně vyšší antioxidační potenciál u extraktu ze zevních listů zelí. Tato skutečnost je zřejmě dána vyšším obsahem jak fenolických látek tak organických kyselin v extraktu ze zevních listů, které mají prokazatelné antioxidační účinky (166).

Zjištěné poznatky byly publikovány (130,171-173).

7. POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

Zkratky jsou vysvětleny v češtině. Pouze u výrazů, které nemají český překlad, nebo se český překlad nepoužívá, jsou u zkratk uvedeny názvy anglické.

AAPH	2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát
ATP	adenosin trifosfát
BMPO	5-tert-butoxycarbonyl 5-methyl-1-pyrrolin N-oxid
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CoA	koenzym A
CUPRAC	cupric ion reducing antioxidant capacity
DAD	diodový detektor
DAF-2	diaminofluorescein-2
DAN	2,3-diaminonafalen
DCF	dichlorofluorescein
DCFH	2'-7'-dichlorofluorescein
DMPO	2,2-dimethyl-2h-pyrrol-1-oxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNTB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ECD	elektrochemická detekce
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
ESR	elektronová spinová rezonance
FL	fluorescein
FRAP	ferric reducing antioxidant power
GC	plynová chromatografie
GSH	glutathion
Hb	hemoglobin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-ESI-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií a ionizací
HRP	peroxidáza z křene
IBG	indoxyl-β-glukuronid

LDL	low density lipoprotein
MDA	malonyldialdehyd
MS	hmotnostní spektrometrie
NADH	nikotinamidadeninukleotid v redukované formě
NADPH	nikotinamidadeninukleotid fosfát, redukována forma
NAT	2,3-naftotriazol
ODS	oktadecylsilan
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
p-HPA	p-hydroxyfenyloctová kyselina
PMS	5-methylfenazinium-methyl-sulfát
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RP	reverzní fáze
RT	retenční čas
SANA	n-sukcinyl(ala) ₃ -p-nitroanilid
SNP	nitroprusid sodný
SOD	superoxiddizmutáza
SPE	extrakce na pevné fázi
TBA	kyselina thiobarbiturová
TEAC	trolox ekvivalent antioxidant capacity
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TNB	5-thio-2-nitrobenzoová kyselina
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné záření
XO	xantin oxidáza

8. LITERATURA

- (1) Štípek S. et al.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Grada Publishing a.s. (2000).
- (2) Bergamini C.M., Gambetti S., Dondi A et al.: *Curr. Pharm. Design* 10, 1611-1626 (2004).
- (3) Halliwell B., Aeschbach R., Löliger J. et al.: *Food Chem. Toxic.* 33, 301-617 (1995).
- (4) Wood J.E., Senthilmohan S.T., Peskin A.V.: *Food Chem.* 77, 155-16 (2002).
- (5) Ferreres F., Sousa C., Valentão P. et al.: *Food Chem.* 101, 549-55 (2007).
- (6) Jayaprakasha G.K., Pati B.S.: *Food Chem.* 101, 410-418 (2007).
- (7) Tiwari O.P., Tripathi Y.B.: *Food Chem.* 100, 1170-1176 (2007).
- (8) Hsu B., Coupar I.M, Ng K.: *Food Chem.* 98, 317-328 (2006).
- (9) Zhao M., Yang B., Wang J. et al.: *Food Chem.* 98, 539-544 (2006).
- (10) Tapia A., Rodriguez J., Theoduloz C. et al.: *J. Ethnopharmacol.* 95, 155-161 (2004).
- (11) Hu C., Kitts D.D.: *Phytomedicine* 12, 588-597 (2005).
- (12) Valentão P., Fernandes E., Carvalho F. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 3476-3479 (2001).
- (13) Gülçin İ.: *Toxicology* 217, 213-220 (2006).
- (14) Montoro P., Braca A., Pizza C. et al.: *Food Chem.* 92, 349-355 (2005).
- (15) Tarpey M.M., Wink D.A., Grisham M.B.: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R431-R444 (2004).
- (16) Zamblé A., Yao D., Martin-Nizard F. et al.: *J. Ethnopharmacol.* 104, 263-269 (2006).
- (17) Unno T., Yayabe F., Hayakawa T. et al.: *Food Chem.* 76, 259-265 (2002).
- (18) Zhou K., Yin J.-J., Yu L.: *Food Chem.* 95, 446-457 (2006).
- (19) Leonard S.S., Keil D., Mehlman T. et al.: *J. Ethnopharmacol.* 103, 288-296 (2006).
- (20) Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: *Chem. Listy* 98, 174-179 (2004).
- (21) Morkunaite-Haimi S., Kruglov A.G., Teplova V.V. et al.: *Biochem. Pharmacol.* 65, 43-49 (2003).
- (22) Kervinen M., Pätsi J., Finel M. et al.: *Anal. Biochem.* 324, 45-51 (2004).
- (23) Sailaja R., Setty O.H.: *J. Ethnopharmacol.* 105, 201-209 (2006).
- (24) Gardner P.R., Fridovich I.: *J. Biol. Chem.* 267, 8757-8763 (1992).
- (25) Melov S., Coskun P., Patel M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 846-851 (1999).
- (26) Zhao H., Kalivendi S., Zhang H. et al.: *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1359-1368 (2003).
- (27) Benov L., Sztejnberg L., Fridovich I.: *Free Radic. Biol. Med.* 25, 826-831 (1998).
- (28) Shao Z.-H., Xie J.-T., Vanden Hoek, T.L. et al.: *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1670, 165-171 (2004).
- (29) Shao Z.-H., Becker L. B., Vanden Hoek T. L. et al.: *Pharmacol. Res.* 47, 463-469 (2003).
- (30) Xie J.-T., Shao Z.-H., Vanden Hoek T.L. et al.: *Eur. J. Pharmacol.* 532, 201-207 (2006).
- (31) Hsieh T.-J., Liu T.-Z., Chia Y.-Ch. et al.: *Food Chem. Toxicol.* 42, 843-850 (2004).
- (32) Margoliash E., Novogrodsky A., Schejter A.: *Biochem J.* 74, 339-48 (1960).
- (33) Husain R., Cillard J., Cillard P.: *Phytochemistry* 26, 2489-2491 (1987).
- (34) Matsugo S., Kayamori N., Hatano Y. et al.: *FEBS Lett.* 184, 25-29 (1985).
- (35) Paulová H., Bochořáková H., Slanina J. et al. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 10, 27 (2000).
- (36) Grootveld M., Halliwell B.: *Biochem. J.* 237, 499-504 (1986).
- (37) Zhou K., Yin J.-J., Yu L.: *Food Chem.* 95, 446-457 (2006).
- (38) Su L., Yin J.-J., Charles D. et al.: *Food Chem.* 100, 990-997 (2007).
- (39) Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Aroma O.I.: *Anal. Biochem.* 165, 215-219 (1987).
- (40) Halliwell B, Gutteridge J.M.C.: *FEBS Lett.* 128, 347-352 (1981).
- (41) Valentão P., Fernandes E., Carvalho F. et al.: *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1320-1323 (2002).
- (42) Valentão P., Fernandes E., Carvalho F. et al.: *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1324-1327 (2002).

- (43) Matjes S., Abraham T.E.: *Food Chem.* 94, 520-528 (2006).
- (44) Tsai Ch.-H., Stern A., Chiou J.-F. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 2137-214 (2001).
- (45) Gutteridge J.M.C.: *Biochem. J.* 243, 709-714 (1987).
- (46) Bektaşoğlu B., Çelik S.E., Özyürek M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 1194-1200 (2006).
- (47) Kilinc E.: *Talanta* 65, 876-881 (2005).
- (48) Cao G., Sofic E., Prior R.L.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 3426 - 3431 (1996).
- (49) Silva E.M., Souza J.N.S., Rogez H. et al.: *Food Chem.* 101, 1012-1018 (2007).
- (50) Fernández-Pachón M.S., Villaño D., Troncoso A.M. et al.: *Anal. Chim. Acta* 563, 101-108 (2006).
- (51) Ou B. a kol. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2772-2777, (2002).
- (52) Li Y., Guo Ch., Yang J. *Food Chem.* 96, 254-260 (2006).
- (53) Dávalos A., Bartolomé B., Gómez-Cordovés C.: *Food Chem.* 93, 325-330 (2005).
- (54) Rehman A., Whiteman M., Halliwell B.: *Br. J. Pharmacol.*, 122, 1702 - 1706, (1997).
- (55) Gonçalves C., Dinis T., Batista M.T.: *Phytochem.* 6, 89-98 (2005).
- (56) Valentão P., Fernandes E., Carvalho F. et al.: *Phytomed.* 10, 517-522 (2003).
- (57) Quettier-Deleu Ch., Gressier B., Vasseur J. et al.: *J. Ethnopharmacol.* 72, 35-42 (2000).
- (58) Badouard C., Masuda M., Nishino H. et al.: *J. Chromatogr. B* 82, 26-31 (2005).
- (59) Sumanont Y., Murakami Y., Tohda M. et al.: *Biol. Pharm. Bull.* 27, 170-173 (2004).
- (60) Jagetia G.Ch., Rao S.K., Baliga M.S.: *Phytother. Res.* 18, 561-565 (2004).
- (61) Panico A.M., Cardile V., Avondo S. et al.: *Phytomedicine* 13, 522-526 (2006).
- (62) Gorinstein S., Cvikrová M., Machackova I. et al.: *Food Chem.* 84, 503-510 (2004).
- (63) Jourd'heuil D., Hallén K., Feelisch M.: *Free Rad Biol Med.*, 28, 409-17 (2000).

- (64) Jourd'heuil D., Gray L., Grisham M. B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 22-26 (2000).
- (65) Radi R., Peluffo G., Alvarez M.N.: *Free Radic. Biol. Med.* 30, 463-488 (2001).
- (66) Ishii Y., Iijima M., Umemura T. et al.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 1325-1331 (2006).
- (67) Zou Y., Kim A.R., Kim J.E. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 5884 - 5890 (2002).
- (68) Kerry N., Rice-Evans C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 591-593 (1997).
- (69) Kerry N., Rice-Evans C.: *J Neurochem.* 73, 247-53 (1999).
- (70) Kooy N.W., Royall J.A.: *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 352-359 (1994).
- (71) Catz S.D., Carreras M.C., Poderoso J.J.: *Free Radic. Biol. Med.* 19, 741-748 (1995).
- (72) Denicola A., Freeman B., Trujillo M. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 49-58 (1996).
- (73) Daiber A., Mehl M., Ullrich V.: *Nitric Oxide* 2, 259-269 (1998).
- (74) Augusto O., Gatti R.M., Radi R. *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 118-125, (1994).
- (75) Ramezani M.S., Padmaja S., Koppenol W.H.: *Chem. Res. Toxicol.* 9, 232 - 240 (1996).
- (76) Balavoine G.G., Geletii Y.V.: *Nitric Oxide* 3, 40-54 (1999).
- (77) Crow J.P., Spruell C., Chen J. et al.: *Free Radic. Biol. Med.* 16, 331-338 (1994).
- (78) Goldstein S., Czapski G.: *Inorg. Chem.* 34, 4041-4048 (1995).
- (79) Thomson L., Trujillo M., Telleri R et al.: *Arch. Biochem. Biophys.* 319, 491-497 (1995).
- (80) Nanjo F., Goto K., Seto R. et al.: *Free Radic. Biol. Med.* 21, 895-902 (1996).
- (81) Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1201-1204 (1998).
- (82) du Toit R., Volsteadt Y., Apostolides Z.: *Toxicology* 166, 63-69 (2001).

- (83) Choi H.-S., Song H.S., Ukeda H. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 4156-4161 (2000).
- (84) Espín J.C., Soler-Rivas C., Wichers H.J.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 648 – 656 (2000).
- (85) McPhail D.B., Gardner P.T., Duthie G.G. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 1937 – 1941 (1999).
- (86) Rice-Evans C., Miller N.J., Paganga G.: *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933–956 (1996).
- (87) Erel O.: *Clin. Biochem.* 37, 277-285 (2004).
- (88) Arnao M. B., Cano A., Acosta M.: *Food Chem.* 73, 239-244 (2001).
- (89) Mantle D., Anderton J.G., Falkous G. et al.: *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 121, 385-391 (1998).
- (90) Re R., Pellegrini N., Proteggente A.: *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231-1237 (1999).
- (91) Miller N. J., Samson J., Candeias L. P. et al.: *FEBS Lett.* 384, 240-242 (1996).
- (92) Verhagen J. V., Haenen G.R.M.M., Bast A.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 3733-3734 (1996).
- (93) Staško A., Polovka M., Brezová V. et al.: *Food Chem.* 96, 185-196 (2006).
- (94) Koleva I.I., Niederländer H.A.G., van Beek T.A.: *Anal. Chem.* 73, 3373 – 3381 (2001).
- (95) Pérez-Bonilla M., Salido S., van Beek T.A. et al.: *J. Chromatogr. A* 1112, 311-318 (2006).
- (96) Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 2407-2410 (1994).
- (97) Dutta S., Padhye S., Priyadarsini K. I. et al.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 2738-2744 (2005).
- (98) Rathee J. S., Hassarajani S. A., Chattopadhyay S.: *Food Chem.* 99, 436-443 (2006).
- (99) Yamanaka N., Oda O., Nagao S.: *FEBS Lett.* 405, 186-190 (1997).
- (100) Rapisarda P., Tomaino A., Lo C.R. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 4718-4723 (1999).
- (101) Yen G.-Ch., Hsieh Ch.-L.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 3952-3957 (1998).

- (102) Terao J., Piskula M., Yao Q.: *Arch. Biochem. Biophys.* 308, 278-284 (1994).
- (103) Suja K.P., Jayalekshmy A., Arumughan C.: *Food Chem.* 91, 213-219 (2005).
- (104) Jayaprakasha G.K., Singh R.P., Sakariah K.K.: *Food Chem.* 73, 285-290 (2001).
- (105) Fukumoto R., Mazza G.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 3597-3604 (2000).
- (106) Haenen G.R.M.M., Bast A.: *FEBS Lett.* 159, 24-28 (1983).
- (107) F. Nielsen, B. B. Mikkelsen, J. B. Nielsen et al.: *Clin Chem.* 43, 1209-14 (1997).
- (108) Dasgupta N., De B.: *Food Chem* 101, 471-474 (2007).
- (109) Silva B.A., Ferreres F., Malva J.O. et al.: *Food Chem.* 90, 157-167 (2005).
- (110) Gallardo C., Jiménez L., García-Conesa M.-T.: *Food Chem.* 99, 455-463 (2006).
- (111) Benzie I.F.F., Strain J.J.: *Anal. Biochem.* 239, 70–76 (1996).
- (112) Rapta P., Mišik V., Staško A. et al.: *Free Radic. Biol. Med.* 18, 901-908 (1995).
- (113) Peyrat-Maillard M.N., Bonnely S., Verset C.: *Talanta* 51, 709-716 (2000).
- (114) Dewick P.M.: *Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach*, Chichester: J. Wiley & Sons Ltd., 136 (1997).
- (115) Valentão P., Fernandes E., Carvalho F. et al. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4989-4993 (2002).
- (116) Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J.: *J. Nut. Biochem.* 13, 572-584 (2002).
- (117) Choi H.R., Choi J.S., Han Y.N.: *Phytother. Res.* 16, 364-367 (2002).
- (118) Cos P., Ying L., Calomme M.: *J. Nat. Prod.* 61, 71-76 (1998).
- (119) Liao K.-L., Yin M.-C.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 2266-2270 (2000).
- (120) Myhrstad M.C.W., Carlsen H., Nordström O. et al.: *Free Radic. Biol. Med.* 32, 386-393 (2002).
- (121) Arts M.J.T.J., Haenen G.R.M.M., Wilms L.C. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 1184-1187 (2002).
- (122) Pietta P.-G. : *J. Nat. Prod.* 63, 1035-1042 (2000).
- (123) Seeram N.P., Henning S.M., Niu Y. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 54, 1599 - 1600 (2006).

- (124)Burda S., Oleszek W. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2774-2779 (2001).
- (125)Kolektiv autorů: *Český lékopis* 2. díl. Praha: Grada Publishing a.s., 1150-1551 (2002).
- (126)Ferrerres F., Valentão P., Llorach R. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 2901 – 2907 (2005).
- (127)Silva B.M., Andrade P.B., Mendes G.C. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 2853-2857 (2000).
- (128)Seidel V., Verholle M., Malard Y.P.: *Phytother. Res.* 14, 93-98 (2000).
- (129)Kirmizibekmez H., Montoro P., Piacente S. et al.: *Phytochem. Analysis.* 16, 1-6 (2005).
- (130)Ferrerres F., Sousa C., Vrchovská V. et al.: *Eur. Food Res. Technol.* 222, 88-98 (2006).
- (131)Silva B.M., Andrade P.B., Mendes G.C. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 2313-2317 (2002).
- (132)Silva B.M., Andrade P.B., Valentão P. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 52, 4705-4712 (2004).
- (133)Reisenauer R.: *Metody matematické statistiky*. Praha: SNTL. 31 (1970).
- (134)Kolektiv autorů: *PDR for Herbal Medicines*, 1. vydání. New Jersey: Medical Economics Company, 683-684 (1998).
- (135)Van Hellemont J.: *Compendium de Phytotherapie*, 1. vydání. Bruxelles: Association Pharmaceutique Belge, 59-60 (1986).
- (136)Newall C.A., Anderson L.A., Phillipson J.D. *Herbal Medicines-A Guide for health-care professionals*. London: The Pharmaceutical Press, 164 (1996).
- (137)Citoglu G.S., Yilmaz B.S., Tarikahya B. et al. *Chem. Nat. Compd.* 41, 299-302 (2005).
- (138)Kolektiv autorů: *French Pharmacopoeia*, 10. vydání (1989).
- (139)Seidel V., Bailleul F., Libot F. A.: *Phytochemistry* 44, 691-693 (1997).
- (140)Seidel V., Bailleul F., Tillequin F.: *Planta Med.* 62, 186-187 (1996).
- (141)Seidel V., Verholle M., Malard Y.P.: *Phytother. Res.* 14, 93-98 (2000).
- (142)Payá M., Halliwell B., Houlst J.R.S.: *Biochem. Pharmacol.* 44, 205-214 (1992).
- (143)Halliwell B.: *Am. J. Med.* 91 (suppl 3C), 14S-22S (1991).
- (144)Puppo A.: *Phytochemistry* 31, 85-88 (1992).
- (145)Powell L.W., Inelbacher K.Y.: *Hemochromatosis*. In Wilson J.D., Braunwald E., Inelbacher K.Y. et al.: *Harrison's principles of internal medicine*. 12th ed., Vol II., New York: McGraw-Hill, Inc., 1825-1829 (1991).
- (146)Scheinberg H.I.: *Wilson's disease*. In Wilson J.D., Braunwald E., Inelbacher K.Y. et al.: *Harrison's principles of internal medicine*. 12th ed., Vol II., New York: McGraw-Hill, Inc., 1843-1845 (1991).
- (147)Ching T.-L., De Jong J., Bast A.: *Anal. Biochem.* 218, 377-381 (1994).
- (148)Visioli F., Bellomo G., Galli C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 60-64 (1998).
- (149)Xiong Q., Hase K., Tezuka Y. et al.: *Planta Med.* 64, 120-125 (1998).
- (150)Wang P., Kang J., Zheng R. et al.: *Biochem. Pharmacol.* 51, 687-691 (1996).
- (151)Zhou Y.C., Zheng R.L.: *Biochem. Pharmacol.* 42, 1177-1179 (1991).
- (152)Xiong Q., Kadota S., Tani T. et al.: *Biol. Pharm. Bull.* 19, 1580-1585 (1996).
- (153)Siciliano T., Bader A., Vassallo A. et al.: *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 341-351 (2005).
- (154)Zhao C., Dodin G., Yuan C. et al.: *Biochimic Biophysic Acta* 1723, 114-123 (2005).
- (155)Delazar A., Gibbons S., Kumarasamy Y. et al.: *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 87-90 (2005).
- (156)Ismailoglu U.B., Saracoglu I., Harput U.S. et al.: *J. Ethnopharmacol.* 79, 193-197 (2002).
- (157)Nilsson J., Pillai J., Öning G. et al.: *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 239-246 (2005).
- (158)Silva B.M., Andrade P.B., Valentão P.: *J. Agric. Food Chem.* 52, 4705-4712 (2004).
- (159)Laranjinha J., Almeida L., Madeira V.: *Free Radic. Biol. Med.* 19, 329-337 (1995).
- (160)Ganzera M., Pöcher A., Stuppner H.: *Phytochem. Anal.* 16, 205-209 (2005).
- (161)Otsuka H.: *J. Nat. Prod.* 55, 1252-1255 (1992).
- (162)Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.: *Trends Plant Sci. - reviews* 2, 152-159 (1997).
- (163)Yokozawa T., Chen C.P., Dong E.: *Biochem. Pharmacol.* 56, 213-222 (1998).

- (164) Fiorani M., De Sanctis R., De Bellis R. et al.: *Free Radic. Biol. Med.* 32, 64-72 (2002).
- (165) Ferreres F., Valentão P., Llorach R. et al.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 2901-2907 (2005).
- (166) Madhavi D.L., Singhal R.S., Kulkarni P.R.: *Natural antioxidants*. In Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K.: *Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives*. New York: Marcel Dekker, 73–76 (1996).
- (167) Braca A., Fico G., Morelli I. et al.: *J. Ethnopharmacol.* 86, 63–67 (2003).
- (168) Galati G., Sabzevari O., Wilson J.X. et al.: *Toxicology* 177, 91-104 (2002).
- (169) Tang Y., Lou F., Wang J. et al.: *Phytochemistry* 58, 1251-1256 (2001).
- (170) Plumb G.W., Price K.R., Rhodes M.J. et al.: *Free Radic. Res.* 27, 429-435 (1997).
- (171) Vrchovská V., Sousa C., Valentão P. et al.: *Food Chem.* 98, 416-425 (2006).
- (172) Vrchovská V., Spilková J., Valentão P. et al.: *Nat. Prod. Res.*, v tisku.
- (173) Nagy M., Spilková J., Vrchovská V. et al.: *Fitoterapia* 77, 395-397 (2006).

9. PŘÍLOHA

SEZNAM PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH A ODBORNÝCH PRACÍ

Publikace:

Vrchovská V., Sousa C., Valentão P., Ferreres F., Pereira J. A., Seabra R.M., Andrade P.B. Antioxidative properties of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) external leaves against DPPH, superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Food Chem.* 98, 416-425 (2006).

Ferreres F., Sousa C., Vrchovská V., Valentão P., Pereira J.A, Seabra R.M., Andrade P.B. Chemical composition and antioxidant activity of tronchuda cabbage internal leaves. *Eur Food Res Technol* 222, 88–98 (2006).

Nagy M., Spilková J., Vrchovská V., Kontšeková Z., Šeršeň F., Mučaji P., Grančai D. Free radical scavenging activity of different extracts and some constituents from the leaves of *Ligustrum vulgare* and *L. delavayamum*. *Fitoterapia* 77, 395-397 (2006).

Vrchovská V.: Ovocné čaje – lahodný zdroj antioxidantů. *Liečivé rastliny - Léčivé rostliny* 42, 146-147 (2006).

Vrchovská V., Spilková J., Valentão P., Sousa C., Andrade P.B., Seabra R.M. Assessing the antioxidative properties and chemical composition of *Linaria vulgaris* infusion. *Nat. Prod. Res.*, v tisku.

Konference – postery:

Spilková J., Vrchovská V.: Antiradikálová aktivita extraktů drog, 5. mezinárodní konference -Medicinal Herbs in Conditions of European Union, 2004, Ľubovnianské koupele, Slovensko, Sborník abstraktů s 21.

Vrchovská V., Spilková J., Sousa C. et al.: Skríning antioxidačních vlastností vnějších listů portugalského zelí (*Brassica oleracea L. var. Costata DC*), Hradecký den léčivých rostlin, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové, ČR, Čes. Slov. Farm. 54, 2005, s 244.

Vrchovská V., Spilková J., Dušek J., Valentão P., Andrade P.B., Seabra R.M. Assessing the Antioxidative Properties and Chemical Composition of *Linaria vulgaris* Infusion. Young Scientists Symposium - Future Trends in Phytochemistry, 2006, Olomouc, ČR, Sborník abstraktů s 89.

Kašparová M., Siatka T., Vrchovská V., Dušek J. The Influence of Elicitation on the Production of Flavonoids and Isoflavonoids in Suspension Cultures of *Trifolium pratense* L. Young Scientists Symposium - Future Trends in Phytochemistry, 2006, Olomouc, ČR, Sborník abstraktů s 90.

Tůmová L., Řimáková J., Vrchovská V., Dušek J. Heavy metals elicitation of *Glycyrrhiza glabra* culture in vitro. Young Scientists Symposium - Future Trends in Phytochemistry, 2006, Olomouc, ČR, Sborník abstraktů s 91.

Martin J., Dušek J., Vrchovská V. Optimization of culture conditions and medium composition for biomass and flavonoid production by *Scutellaria baicalensis* suspension cultures. Young Scientists Symposium - Future Trends in Phytochemistry, 2006, Olomouc, ČR, Sborník abstraktů s 92.

Studijní pobyty:

2004/2005 a 2005/2006: Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University Porto, Portugalsko.