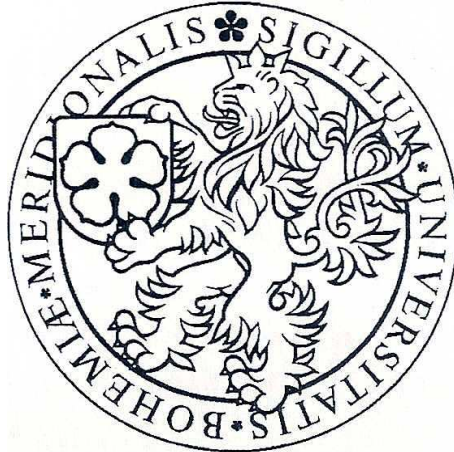


**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

PEDAGOGICKÁ FAKULTA



**OBSAH VYBRANÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK
V LÉČIVÝCH ROSTLINÁCH**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Zuzana Krejčí

Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Dadáková, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

České Budějovice 2007

ABSTRAKT

Práce se zabývá problematikou stanovení obsahu fenolických látek v léčivých rostlinách tradičně využívaných v České republice. Fenolické látky jsou skupinou přírodních sloučenin výhradně rostlinného charakteru. Malou část této rozsáhlé skupiny sloučenin tvoří flavonoidy. Z flavonoidů je nejvíce pozornosti věnováno především kvercetin a rutin. Je to dáno jejich snadnou dostupností a velmi významnou biologickou aktivitou. Tyto látky vykazují mnohé příznivé biologické účinky. Mají výrazné antioxidační vlastnosti, zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály a vazbou do chelátů inaktivují některé prooxidační kovové ionty. Poslední výzkumy ukazují, že přírodní flavonoidy mohou díky těmto vlastnostem předcházet vzniku chronických onemocnění, jako jsou ateroskleróza, kardiovaskulární a nádorová onemocnění. Flavonoidy jsou využívány v tradičním i moderním lékařství. Studie dokazují, že cenným zdrojem takto biologicky účinných látek jsou tradičně používané léčivé rostliny.

Obsah fenolických látek byl stanoven metodou micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC) a metodou kapalinové chromatografie (HPLC) v souboru 8 léčivěk běžně používaných v České republice. Pro analýzu byl použit lyofilizovaný a volně sušený materiál. V lyofilizovaném materiálu byl nalezen nejvyšší obsah celkového kvercetinu v tužebníku jilmovém (14200 mg/kg sušiny) a v bříze bělokoré (11800 mg/kg sušiny). Nejvyšší obsah rutinu obsahoval bez černý (17700 mg/kg sušiny). Podobné hodnoty byly naměřeny ve volně sušeném materiálu. Obsah celkového kvercetinu a rutinu se během sušení nezměnil.

ABSTRACT

The work has been inquired into the problem of content determination of phenolic substances in medicinal plants traditionally used in Czech Republic. Phenolic substances belong to a group of natural compounds, which are purely plant origin. Flavonoids are a part of this extensive group of compounds. As for flavonoids, most attention is paid to quercetin and rutin. It is caused by their easy availability and very significant biological activity. These compounds embody a lot of positive biological effects. They have expressive antioxidant properties, inhibit lipid peroxidation, scavenge free oxygen radicals and bond into the chelates they inactivate some prooxidant metal ions. The latest researches have shown that thanks to their properties natural flavonoids can occurrence of chronic diseases, such as arterosclerosis, cardiovascular or tumor disorder. Flavonoids are exploited both in traditional and modern medicine. Some other studies have evidenced that valuable sources of these biologically effective substances are traditionally used medicinal plants.

Content of phenolic substances was determined by method of micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) and liquid chromatography (HPLC) in collection of 8 medicinal plants usually used in Czech Republic. For analysis was used freeze-dried and dried plant material. In freeze-dried material was found the highest content of total quercetin in *Filipendula ulmaria* L. (14200 mg/kg of dry weight) and in *Betula pendula* Roth. (11800 mg/kg of dry weight). The highest content of rutin contained *Sambucus nigra* L. (17700 mg/kg of dry weight). Similar values was measured in dried plant material. The content of total quercetin and rutin during drying was unchanged.

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, trpělivost vynaloženou v průběhu práce a za pomoc při vypracování literární rešerše. Děkuji také Ing. Tamaře Pelikánové za pomoc při práci v laboratoři a RNDr. Naděždě Vrchotové CSc. za poskytnutí výsledků z HPLC.

Dále bych chtěla poděkovat Ing. Štěpánce Chmelové, Ph.D. za péči vynaloženou při pěstování uznaných odrůd léčivek na pozemku PF JU, jejichž materiál byl také použit k analýze.

Tato práce byla vypracována za podpory projektu MSM 6007665806 a GAČR 525/05/2546.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Obsah vybraných fenolických látek v léčivých rostlinách“ vypracovala samostatně, s použitím literatury uvedené v seznamu.

V Českých Budějovicích

20. dubna 2007

OBSAH

I. LITRÁRNÍ ČÁST		4
1. ROSTLINNÉ METABOLITY		4
1.1 Fenolické látky		4
1.2. Fenolické kyseliny		5
1.3. Flavonoidní látky		5
2. FLAVONOIDY		6
2.1. Výskyt		6
2.2. Struktura		6
2.3. Vlastnosti		8
2.4. Metabolismus		9
2.5. Využití flavonoidů		11
3. LÉČIVÉ ROSTLINY		12
3.1. Tužebník jilmový		12
3.1.1. Obecné znaky		12
3.1.2. Použití v léčitelství		13
3.1.3. Obsah fenolických látek		13
3.2. Jitrocel kopinatý		14
3.2.1. Obecné znaky		14
3.2.2. Použití v léčitelství		15
3.2.3. Další zástupci čeledi jitrocelovitých (<i>Plantaginaceae</i>)		15
3.2.4. Obsah fenolických látek		16
3.3. Bez černý		17
3.3.1. Obecné znaky		17
3.3.2. Použití v léčitelství		18
3.3.3. Obsažené látky		19
3.4. Bříza bělokorá		20
3.4.1. Obecné znaky		20
3.4.2. Použití v léčitelství		20
3.4.3. Obsah fenolických látek		21
3.5. Meduňka lékařská		23
3.5.1. Obecné znaky		23
3.5.2. Použití v léčitelství		23

3.5.3.	Obsah fenolických látek	23
3.6.	Řepík lékařský	25
3.6.1.	Obecné znaky	25
3.6.2.	Použití v léčitelství	26
3.6.3.	Obsah fenolických látek	26
3.7.	Kontryhel obecný	28
3.7.1.	Obecné znaky	28
3.7.2.	Použití v léčitelství	28
3.7.3.	Obsažené látky	28
3.8.	Popenec břechťanovitý	29
3.8.1.	Obecné znaky	29
3.8.2.	Použití v léčitelství	30
3.8.3.	Obsažené látky	31
3.8.4.	Obsah fenolických látek	31
4.	ANALYTICKÉ METODY	32
4.1.	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	32
4.2.	Kapilární elektroforéza (CE)	33
4.2.1.	Variety kapilární elektroforézy	34
4.2.2.	Kapilární zónová elektroforéza	35
4.2.3.	Micelární elektrokinetická chromatografie	36
II. CÍLE PRÁCE		38
III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST		39
1.	Odběr a skladování vzorků	39
2.	Stanovení obsahu celkového kvercetinu a rutinu metodou MECC	40
2.1.	Chemikálie a standardy	40
2.2.	Příprava roztoků	40
2.3.	Laboratorní sklo a přístroje	40
2.4.	Metodika stanovení	41
2.4.1.	Stanovení celkového kvercetinu v lyofilizovaných a sušených vzorcích bylin	41
2.4.2.	Stanovení rutinu v lyofilizovaných a sušených vzorcích bylin	42
2.4.3.	Měření na kapilární elektroforéze	43

3.	Stanovení vybraných fenolických látek metodou HPLC	44
3.1.	Příprava extraktu	44
3.2.	Identifikace vybraných fenolických látek metodou HPLC	44
3.3.	Schéma použitého gradientu	44
IV. DISKUSE A ZÁVĚR		45
1.	Diskuse	45
1.1	Stanovení obsahu celkového kvercetinu	46
1.2.	Stanovení obsahu rutinu	47
1.3.	Chromatografické profily jednotlivých léčiv	47
2.	Závěr	53
V. POUŽITÁ LITERATURA		54
VI. PŘÍLOHY		58

I. LITERÁRNÍ ČÁST

1. ROSTLINNÉ METABOLITY

Rostliny tvoří mnoho sloučenin, podle funkce bývají děleny na primární a sekundární metabolity. Primární metabolity souvisí se základními funkcemi organismu, patří sem sacharidy, lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Tyto sloučeniny se podílejí především na stavbě buněk. Sekundární metabolity nejsou bezprostředně důležité pro okamžité udržení života organismu, nemají základní stavební funkce, ale svými účinky zajišťují zachování biologického druhu. Rostliny syntetizují sekundární metabolity jako odpověď na různé stresové vlivy prostředí (např. změny intenzity spektra, teplotní změny, kompetice mezi rostlinami, ohrožení herbivory a mikrobiálními patogeny). Jsou rozhodující pro reprodukci rostlin, hrají důležitou roli při regulaci růstu a expresi genů. Rostliny spotřebují velké množství energie na syntézu a ukládání sekundárních metabolitů. Mezi sekundární metabolity patří terpenické látky, alkaloidy, fenolické látky a polyamidy (Berhow a Vaughn, 1999).

1.1. Fenolické látky

Fenolické látky jsou rozsáhlou a neobyčejně různorodou skupinou sekundárních metabolitů, které jsou syntetizovány v cyklu kyseliny šikimové (Berhow a Vaughn, 1999, Harmatha, 2002). Rostlinné fenolické látky vznikají jen malým počtem několika základních biogenetických drah, které vedou k omezenému počtu dvou či tří klíčových meziproductů. Z těch pak dále vznikají jednoduchými enzymatickými transformacemi stovky až tisíce tzv. periferních derivátů. Základním klíčovým meziproductem biosyntézy je kyselina skořicová nebo její biogenetické ekvivalenty, tj. hydroxy (i methoxy) deriváty: kyselina kumarová, kávová, ferulová a sinapová. Z těchto klíčových látek pak vznikají další meziproducty druhého stupně, které se dále diverzifikují specifickými hydroxylacemi, dehydrogenacemi, metoxylacemi, fenoloxidacemi, esterifikacemi, glykosilacemi, radikálovými oligomeracemi apod. V případě jen jediné skupiny fenylypropanových derivátů tak narůstá jejich počet do stovek (v případě ligninů) nebo až do tisíců (např. u flavonoidů). Nejběžnější typy rostlinných fenolických látek lze klasifikovat například podle počtu uhlíků a jejich vzájemných vazeb (Harmatha, 2002):

jednoduché fenoly

fenolické kyseliny a aldehydy

benzofenony s dibenzopyrany

antrachinony a stilbeny

acetofenony, benzofurany, izobenzofurany	flavonoidy a chalkony
fenylpropanoidy, benzopyranoidy, kumariny	lignany a neolignany
naftochinony	kondenzované taniny
ageratochromeny a prekoceny	lignin
dibenzofurany	katecholmelaniny

1.2. Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny jako je např. kyselina kávová, ferulová nebo galová se nejčastěji nacházejí v rostlinách ve formě esterů, v nichž se váží karboxylem na hydroxylové skupiny organických kyselin nebo sacharidů. Nejběžnější látkou tohoto typu je kyselina chlorogenová (5-kofeylchinová kyselina), která se vyskytuje ve vysokém množství v kávě. Kyselina ferulová je nejčastěji součástí vlákniny, kde je esterovou vazbou vázána na hemicelulózy. Kyselina galová se vyskytuje rovněž ve formě esterů, např. v galotaninech je vázána na glukózu (Slanina a Táborská, 2004).

1.3. Flavonoidní látky

Flavonoidní látky jsou vývojově velmi starou skupinou sloučenin. V současnosti se na ně zaměřuje mnoho studií. Z této velké skupiny je nejvíce pozornosti věnováno především kvercetin a rutin. Je to dáno jejich snadnou dostupností a velmi významnou biologickou aktivitou.

2. FLAVONOIDY

2.1. Výskyt

Flavonoidy patří mezi sekundární rostlinné metabolity. Zvířata nejsou schopna syntetizovat aromatické sloučeniny s benzenovým kruhem z alifatických prekurzorů. Z tohoto důvodu zvířata a lidé musí tyto organické antioxidanty přijímat v potravě (Hässig et al., 1999).

Ve velmi širokém spektru se flavonoidy vyskytují u krytosemenných rostlin, obzvláště v listech, květech a pylu, méně často v kořenech, semenech, kůře a plodech. Společně s anthokyaniny vytvářejí flavonoidy růžové, červené, světle fialové a modré zabarvení květin, ovoce a zeleniny. Nejvíce flavonoidů je v nadzemních částech rostlin, v částech pod povrchem půdy byla nalezena pouze stopová množství (Hertog et al., 1992).

V cévnatých rostlinách bylo nalezeno více než 10 000 druhů flavonoidních sloučenin (Berhow et al., 1999), které se liší typem a množstvím. Je to způsobeno odlišností podmínek, ve kterých rostliny vyrůstají a také stupněm zralosti rostlin. Rostliny vytvářejí flavonoidy k ochraně proti houbovým parazitům, býložravcům a patogenům. Flavonoidy se účastní redoxních procesů a obranných reakcí rostlin (Kolesnikov a Gins, 2001).

2.2. Struktura

Flavonoidy jsou skupinou polyfenolických látek, které se od sebe liší chemickou strukturou a vlastnostmi. Do současné doby bylo identifikováno více než 10 000 různých flavonoidů, které rozdělujeme do jednotlivých tříd v závislosti na oxidačním stavu heterocyklu obsahující atom kyslíku (Slanina a Táborská, 2004):

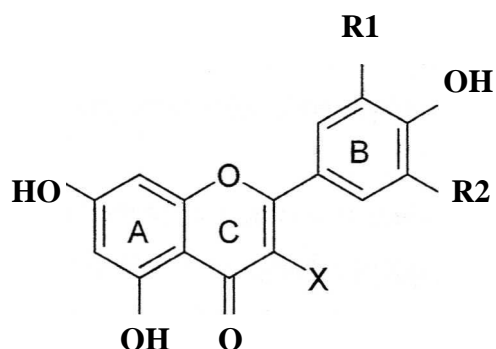
flavony	anthokyanidiny
flavonony	leukoanthokyaniny
flavonoly	chalkony
flavononoly	dihydrochalkony
izoflavony	aurony
anthokyaniny	katechiny

Společným základem flavonoidů je difenylpyranová struktura (C₆ – C₃ – C₆), která je odvozena od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem. Uhlíkové atomy v C a A kružích číslujeme od 2

do 8, v kruhu B od 2' do 6'. Tato základní struktura umožňuje velké množství strukturních a substitučních variací v kruzích A, B i C uvnitř každé třídy flavonoidů (Holman a Katan, 1998). Nejrozšířenějšími flavonoidy jsou tři hlavní flavonoly – kvercetin, kempferol a myricetin, a dva hlavní flavony – luteolin a apigenin. Hlavní rozdíl mezi flavony a flavonoly je přítomnost hydroxyskupiny v poloze C3 u flavonolů (Hertog et al., 1992a).

Flavonoidy se vyskytují obvykle jako O-glykosidy, obsahují tedy ve své molekule necukernou součást (aglykon) a cukernou složku. D-glukóza je nejčastěji se vyskytující cukerný zbytek. Dalšími cukernými složkami jsou D-galaktóza, L-rhamnóza, L-arabinóza, D-xylóza a D-glukuronová kyselina. V rostlinách bylo nalezeno více než 80 různých cukrů vázaných na flavonoidy, jejichž postavení v benzenových kruzích se může měnit. Následkem toho bylo v přírodě nalezeno 179 různých kvercetinových glykosidů (Hollman et al., 1996). Téměř všechny hlavní glykosidy jsou substituovány v pozici 3 a nejhojnější jsou deriváty kvercetinu (Rhodes a Price, 1997). Nejčastěji je připojen jeden glykosid, někdy však jsou substituovány dva nebo tři hydroxyly polyfenolu. Část flavonoidní molekuly bez cukru se nazývá aglykon. Volné aglykony se vyskytují zřídka. Aglykon nebo sacharidová složka může být dále substituována hydroxykyselinou, např. kyselinou jablečnou nebo galovou (Slanina a Táborská, 2004).

Obr. č.1 Struktura flavonoidů



Flavonoly: X=OH; kvercetin R1=OH, R2=H

kempferol R1=H, R2=H

myricetin R1=OH, R2=OH

Flavony: X=H; apigenin R1=H, R2=H

luteolin R1=OH, R2=H

2.3. Vlastnosti

Flavonoidy vykazují široký rozsah biologických účinků na buněčné systémy savců. Používají se v tradičním i moderním lékařství. V poslední době bylo věnováno mnoho pozornosti jejich antioxidačním vlastnostem a jejich inhibiční úloze v různých stupních vývoje nádoru ve studiích na zvířatech (Hollman a Katan, 1998). Biologické účinky zahrnují antibakteriální, antivirové, protizánětlivé, a protialergické účinky, dále mají vliv na imunitní systém a synergický účinek na vitamin C. Zájem o flavonoidy v lidské výživě vyvolala jejich potenciální role v prevenci rakoviny (Lachman et al., 1999).

Flavonoidy inhibují peroxidaci lipoproteinů, nahromadění plaku, kapilární permeabilitu a křehkost vlásečnic a tlumí aktivitu enzymových systémů zahrnujících cyklooxygenázu a lipoxygenázu. Flavonoidy projevují tyto účinky jak antioxidanty, lapače volných radikálů a jako chelátory bivalentních kationtů.

Antioxidační aktivita flavonoidů je závislá na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule, vliv má i jejich glykosylace. Optimální radikálově likvidační vlastnosti byly nalezeny pro *o*-dihydroxy strukturu v kruhu B, dvojná vazba mezi uhlíky 2 a 3 (C2-C3) a 4-oxo funkční skupinu v kruhu C a 3 a 5 -OH skupiny na kruzích A a C. Flavonoly, jako je např. kvercetin, spojují tyto vlastnosti, likvidují hyperoxidové anionty (O_2^-), hydroxyradikály, lipidové peroxyradikály a tvoří cheláty s některými ionty kovů (Fe^{2+} , Cu^{2+}) (Cook a Samman, 1996).

Flavonoidy jsou přítomné především ve vakuolách, zatímco radikály a aktivní sloučeniny kyslíku (hydroxylové radikály $\bullet OH$, peroxid vodíku H_2O_2 , radikál hyperoxidového anionu $\bullet O_2^-$, radikál atomu kyslíku $\bullet O\bullet$, resp. kyslíkový radikálový anion $\bullet O^-$) jsou díky fotosyntetickému transportu elektronů přítomné v chloroplastech. Peroxid vodíku však může difundovat přes membrány a reakcí s molekulou flavonoidu tak vytváří flavonoidní fenoxyllový radikál, který reaguje s kyselinou askorbovou na radikál kyseliny dehydroaskorbové, který se cytosolickou dehydroaskorbátreduktázou přeměňuje zpět na kyselinu askorbovou (Velíšek, 1999). Flavonoidy také redukují volné radikály oxidu dusnatého. Flavonoidy obsažené v cytoplazmě jsou součástí sítě antioxidantů, která zahrnuje kyselinu α -lipoovou, flavonoidy a vitamin C ve vakuolách a vitamin E – tokoferol v buněčných stěnách, glutathion v cytoplazmě, β -karoten a další (Lachman et al., 1999).

Kvercetin, hlavní představitel podtřídy flavonolů je silný antioxidant, předchází oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou. Lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL), jsou považovány za rozhodující prostředníky v utváření arterosklerotického plaku. Mnoho epidemiologických studií ukazuje opačnou souvztažnost mezi příjmem flavonoidů v potravě a úmrtností na srdeční onemocnění, která je z části vysvětlována inhibicí oxidace LDL

a sníženým úhrnem krevních destiček (Cook a Samman, 1996; Hollman a Katan, 1998). Při zvýšeném příjmu flavonolů a flavonů je snížení rizika úmrtnosti na kardiovaskulární onemocnění větší než 50 % (Hollman et al., 1996). Flavonoidy zapříčiňují snížením kapilární permeability antihistaminový účinek a používají se jako venofarmaka (Kolesnikov a Gins, 2001).

Tyto přirozeně se vyskytující rostlinné sloučeniny mohou zabránit nádorovému bujení v různém stupni vývoje (Hollman a Katan, 1998). Některé studie naznačují, že příjem potravin obsahující flavonoidy, může chránit organismus před některými formami rakoviny, především rakoviny plic, trávícího traktu a rakoviny prsu u žen a rakoviny prostaty u mužů. Rovněž řada experimentů na laboratorních zvířatech a nádorových buňkách prokázala antikarcinogenní účinky rostlinných polyfenolů. Flavonoidy mohou také působit proti vzniku krevních sraženin a tímto způsobem snižovat riziko infarktu myokardu nebo mozkové mrtvice (Slanina a Táborská, 2004).

Řada studií ukázala, že flavonoidy mohou inhibovat rozsáhlé enzymové systémy savců. Byly popsány účinky hlavních flavonů a flavonolů na 24 různých enzymech nebo enzymových systémech. Mnohé z těchto enzymů jsou zapojeny do důležitých biochemických drah, které regulují buněčné dělení a růst, agregaci krevních destiček, detoxikaci a zánětlivé či imunitní reakce. Účinky flavonoidů byly zkoumány v buněčných systémech zvířat s různým stupněm rakovinového procesu a byl nalezen jejich vliv na imunitní systém a na hemostázu (Middleton a Kandaswami, 1993; Hollman et al., 1996).

Bylo zveřejněno několik studií mutagenity některých hlavních flavonoidů, např. kvercetinu, kempferolu a myricetinu. Obavy z mutagenity flavonoidů v bakteriálním systému spustily mnoho výzkumů flavonolu kvercetinu, ale mutagenita flavonoidů nebyla u savců nalezena. Byly také nalezeny důkazy karcinogenity těchto flavonoidů, ale nebyly potvrzeny jinými studiemi (Hertog et al., 1992a). Karcinogenita kvercetinu ve studiích na zvířatech byla negativní. Naopak antikarcinogenní a antiproliferativní účinky kvercetinu a ostatních flavonoidů se stávají stále více zřejmými (Middleton a Kandaswami, 1993; Hollman et al., 1996).

2.4 Metabolismus

Epidemiologická data podporují roli flavonolů jako antioxidantů v prevenci cévního onemocnění srdce. Vstřebávání z potravy je předpokladem pro vztah mezi flavonoly a cévním onemocněním srdce. Navíc by metabolismus flavonolů po jejich vstřebání neměl významně

inhibovat jejich antioxidační funkce (Hollman a Katan, 1998). Průměrný příjem flavonoidů je odhadován na 1g/den (Hertog at al., 1992b).

Vstřebávání, metabolismus, následná distribuce a vylučování flavonoidů u člověka patří k málo studovaným oblastem jejich výzkumu. Více je toho známo ze studií na zvířatech. Vstřebávání flavonoidů vázaných na cukry (glykosidů), které jsou obsaženy v potravě, bylo dlouhou dobu považováno za zanedbatelné. Pouze volné flavonoidy, tedy bez cukerné složky, byly považovány za schopné projít střevní stěnou. Do střeva ale nejsou vylučovány žádné enzymy štěpící tyto vazby a tyto enzymy nejsou přítomny ani ve střevní stěně. Přesto jsou játra a flóra tlustého střeva dvě hlavní místa metabolismu flavonoidů. Existují důkazy o O-metylaci, sulfaci a glukoronidaci hydroxylových skupin v játrech. Důležité se zdá být vylučování glukoronidů a sulfátů žlučí. Bakterie v tlustém střevě hydrolyzují konjugáty, které pravděpodobně umožňují vstřebávání uvolněných aglykonů. Tyto mikroorganismy také podstatně degradují strukturu flavonoidů rozštěpením heterocyklického kruhu. Předpokládají se tři hlavní typy rozštěpení kruhu u katechinů, flavonolů, flavonů a flavanonů, vedoucím k různým fenolickým kyselinám nebo jejich laktonům. Tyto primárně vyprodukované fenolické kyseliny jsou náchylné k sekundárním reakcím jako je β -oxidace, redukce, demethylace, dehydroxylace a dekarbonace. Fenolické kyseliny jsou vstřebávány a dále vylučovány močí. (Hollman a Katan, 1998).

Bylo studováno vstřebávání a metabolismus katechinu na šesti zdravých mužských dobrovolnících, kteří přijímali dávku 4,2 g katechinu, což je 92,3 mg/kg lidské váhy. Během 6 hodin se fenoly objevily v plazmě a hodnoty se vrátili do normálu po 96 hodinách. Fenolické sloučeniny byly vyloučeny do moči jak ve volné, tak v konjugované formě (obsahovaly sulfátové konjugace). Přibližně 19% přijaté dávky bylo vyloučeno stolicí v nezměněné podobě. Je to nepříznivý děj, který je vyvoláný příjmem jedné velké dávky katechinu (Cook a Samman, 1996).

Také byl zkoumán metabolismus kvercetinu na šesti dobrovolnících (čtyři muži, dvě ženy) ve věku mezi 21 a 32 lety. Po ústním požití jednorázové dávky 4g nebyla objevena v plazmě ani v moči měřitelná koncentrace flavonoidů nebo jejich derivátů. Nicméně asi 53% této ústní dávky bylo znovu objeveno ve stolici v nezměněné formě. Z toho vyplývá, že bylo absorbováno pouze 1% z původní dávky 4g kvercetinu (tedy 40 mg). Odhadovaný průměrný příjem všech flavonoidů z potravních zdrojů je mezi 23 až 170 mg/den. Absorpce 40 mg proto není podceňována. Studium metabolismu jednoho flavonoidu, konkrétně kvercetinu v jedné farmakologické dávce, která vysoce převyšuje odhadovanou spotřebu flavonoidů, nemusí zcela vysvětlovat metabolismus flavonoidů z potravních zdrojů (Cook a Samman, 1996).

Hollman a Katan studovali a kvantitativně určili vstřebávání různých potravních forem kvercetinu. Ačkoli pouze flavonoidní aglykony jsou považovány za schopné přejít přes střevní stěnu, aglykony kvercetinu podané ústně ve studiích na lidském organismu byly vstřebány neúspěšně (pouze 1%). U kryš se projevila po orálním podání kvercetinového aglykonu absorpce okolo 20%. U lidí s ileostomií byla potvrzena hodnota 24%. Tato data ukazují, že lidé vstřebávají znatelné množství kvercetinu. Absorpce glykosidů v tenkém střevě je tedy možná. Potravní antioxidant kvercetin může významně zvýšit antioxidační kapacitu krevní plazmy. Vstřebaný kvercetin se z krve vylučuje velmi pozvolna (Hollman a Katan, 1998).

Metabolismus flavonoidů není jednotný vzhledem k jejich nejednotné struktuře a široké distribuci v jídle (Cook s Samman, 1996). Následující farmakokinetické studie potravních kvercetinových glykosidů ukázaly zřetelné rozdíly ve vstřebávání a biologické použitelnosti flavonoidů, ta je pravděpodobně řízena typem glykosidu (Hollman a Katan, 1998).

2.5 Využití flavonoidů

Využití flavonoidů (zvaných též pro mnohostranný účinek na lidský organizmus bioflavonoidy) je v terapii mnohostranné. Jsou však dvě základní indikace, kde se uplatňují především, a to jako léky proti kornatění tepen a jako prostředky proti nepravidelnostem krevního oběhu. Flavonoidy podporují odolnost krevních vlásečnic postižených např. při vysokém krevním tlaku, cukrovce dalších onemocněních. Jsou to látky upravující příznivě metabolismus lidí ve vysokém věku, a proto bývají součástí většiny geriatrických preparátů. Některé flavonoidy vykazují příznivý močopudný a antiseptický účinek, působí proti křečím, regenerují poškozenou jaterní tkáň atd. (Jirásek a Starý, 1986).

3. LĚČIVÉ ROSTLINY

Rostliny byly využívány jako zdroj potravy i pro lékařské účely již po staletí. I dnes hrají byliny významnou roli v udržování zdraví člověka a zlepšování kvality života jako cenné složky nápojů, koření, léků, barviv a kosmetiky. Široká škála bylin či dnes velmi populárních bylinných preparátů obsahuje sloučeniny s biologickou aktivitou poskytující pomoc pro běžná onemocnění jako jsou nachlazení, kašel, zácpa, střevní potíže, horečka, nespavost, úzkost atd.. Zájem je soustředěn na rostliny mající vlastnosti, které snižují riziko kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny a které stimulují a posilují imunitní systém. K aktivním sloučeninám identifikovaným v širokém množství rostlin patří flavonoidy, které svými účinky vytváří ochranu proti chronickým onemocněním.

WHO odhaduje, že přibližně 80% obyvatel světa spoléhá na tradiční lékařství v péči o své zdraví, ale mnohé z těchto léčebných procesů zahrnuje používání rostlinných extraktů nebo jejich aktivních složek. Kromě toho mnoho západních léčiv má v rostlinných extraktech svůj původ (Craig, 1999).

Je nutné také zdůraznit, že pouze správné určení a používání bylin je bezpečné a může poskytovat léčebné výhody, zatímco nesprávné nebo nadměrné užívání může být riskantní. Je obecně známo, že mnoho rostlin působí jako lék v menších množstvích, ale ve vysokých dávkách mohou být toxické.

3.1. Tužebník jilmový

3.1.1. Obecné znaky

Tužebník jilmový (*Filipendula ulmaria* L.) je statná vytrvalá bylina dorůstající výšky až dva metry, patří do čeledi růžovitých (*Rosaceae*). Z plazivého, článkovaného oddenku vyrůstají četné přímé, pevné a hranaté lodyhy. Listy jsou přetřhaně lichozpeřené, s dvěma až pěti jařmy široce vejčitých lístků, z nichž koncový je dlanitě laločnatý. Palisty jsou nápadně široce srdčité a zubaté. Na líci jsou listy tmavě zelené, na rubu zelené nebo běloplstnaté. Četné malé nažloutlé kvítky, vonící po hořkých mandlích, skládají bohatá květenství – kuželovité vrcholíky. Tyčinky květů jsou dlouhé a vyčnívají z kvítku ven.

Tužebník jilmový roste na živných vlhkých loukách, na březích potoků a v příkopech, kde tvoří obvykle velké kolonie, nápadné výškou rostlin, bělavými květenstvími a vůní. Po opylení vznikají lysé, zprvu zelené a později hnědé měchýřky, charakteristicky šroubovitě stočené. Tato rostlina je domovem téměř v celé Evropě a v oblasti od Sibíře po Malou Asii. Trhají se listy, květy a špičky výhonků v době květu (v červenci až srpnu) dříve, než se vytvoří příliš mnoho plodů (Tříška, 1979).

3.1.2. Použití v léčitelství

Tužebník jilmový je známý jako léčivka už od dob starověku. V léčitelství se používá především květ tužebníku, zřídka i nať. Květy tužebníku mají protizánětlivé, antirevmatické a svíravé účinky, pomáhají při hojení ran. Extrakt z rostliny obsahující flavonoidy má silnou antioxidační aktivitu (Papp et al., 2004), snižuje kapilární permeabilitu krevních vlásečnic, působí proti srážení krve a vykazuje protirakovinné účinky (Krasnov et al., 2006). Vědecky uznávané je užití květu a natě pro podpůrnou léčbu onemocnění z nachlazení. V empirickém léčitelství se tužebník pro močopudné působení používá i při dně a nemocích močového měchýře a ledvin. Nepoužívá se při přecitlivělosti na kyselinu salicylovou. Při předávkování se mohou objevit žaludeční potíže a nevolnost (Mayer et al., 2004).

3.1.3. Obsah fenolických látek

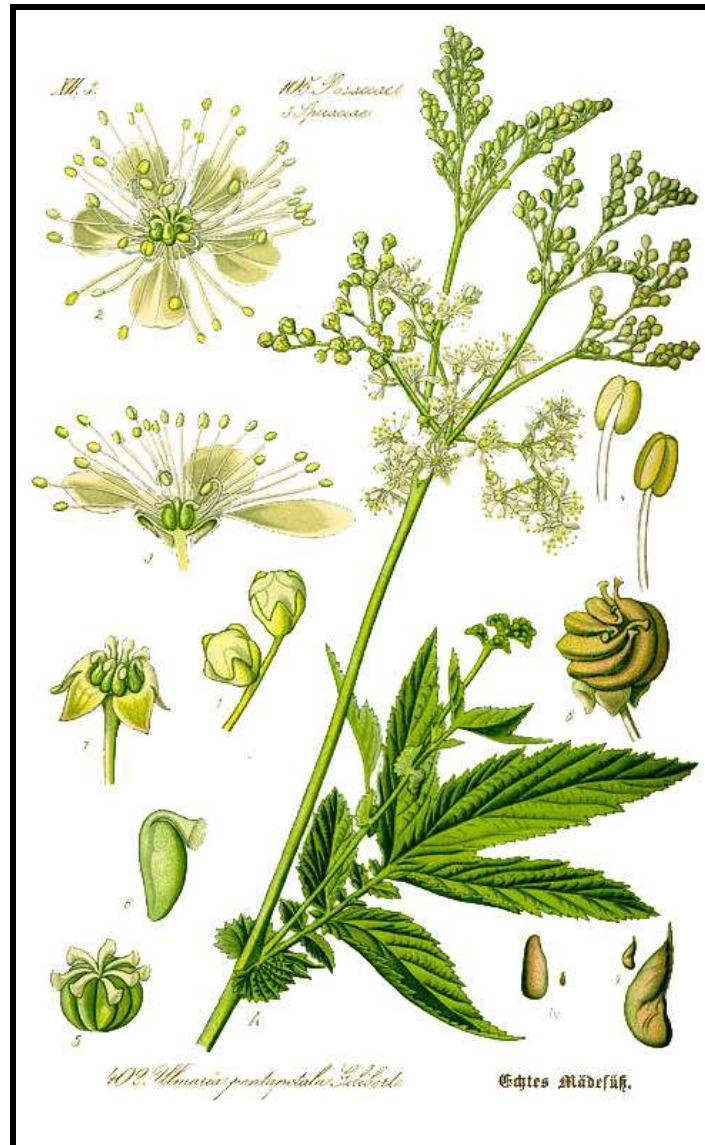
Extrakt tužebníku jilmového, který má velmi příznivou antioxidační kapacitu, byl zkoumán metodou HPLC spojenou s DAD a hmotnostní spektrometrií (MS). Tato technika dovoluje zjištění hlavních sloučenin extraktu. V různých částech rostliny byl kvalitativně zjištěn obsah těchto flavonoidů a jejich glykosidů: kvercetin, rutin, hyperosid, avikularin, spireosid, kvercetin-3-O- β -glukuronid a kempferol-4'-O- β -glukosid. Dále byly v extraktu zjištěny aglykony kempferolu a kvercetinu (Papp et al., 2004).

Rostlina také obsahuje na 20 fenolických kyselin, z nichž jsou nejvíce dominantní kyselina galová, kumarová a vanilinová (Krasnov et al., 2006).

Tab. č.1 Flavonoidové glykosidy v listech tužebníku jilmového

Aglykony	kempferol
	kvercetin
4'-O-glukosidy	kempferol-4'-O- β -glukosid
	kvercetin-4'-O- β -glukosid (spireosid)
3-O-rhamnosidy	kvercetin-3-O- β -rhamnosid (kvercetin)
3-O-rutinosidy	kempferol-3-O- β -rutinosid (nicotiflorin)
	kvercetin-3-O- β -rutinosid (rutin)
3-O-glukoronidy	kvercetin-3-O- β -glukuronid

(Papp et al., 2004)



Obr. č.2 Tužebník jilmový (*Filipendula ulmaria* L.)

3.2. Jitrocel kopinatý

3.2.1. Obecné znaky

Jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata* L.) je vytrvalá bylina patřící do čeledi jitrocelovitých (*Plantaginaceae*). Pod zemí vytváří svazčité kořeny s krátkým oddenkem, z něhož vyrůstá růžice přízemních listů a květonosné stvoly. Listy jsou kopinaté, pozvolna zúžené v řapík s podélnou, vystouplou žilnatinou. Květní stvoly jsou vzpřímené, rýhované, zakončené klasovitým květenstvím s nahloučenými drobnými květy. Květy rozkvétají odspodu a pak postupně i na mladších stvolech, takže celá rostlina kvete od května po celé léto. Plodem je dvojsemenná tobolka.

Jitrocel kopinatý je domácím druhem v Evropě a severní i střední Asii, jako zavlečený roste i jinde. Ve volné přírodě je hojný na lukách, pastvinách, na mezích v příkopech a jako plevel i na polích, hlavně v jetelovinách. Přestože rostlina je hojná, jako léčivka se pěstuje. Uznávanou odrůdou je např. jitrocel Libor.

Sbíranou a sklízenou částí rostliny jsou listy (*Folium plantaginis*). Sbírají se ručně v období od května do září seřezáváním nebo sežínáním celých listových růžic nízko u země. V polních kulturách se jitrocel sklízí dvakrát až třikrát za sezónu. Materiál se pak suší v tenké vrstvě ve stínu za dobrého větrání nebo v sušárně při teplotě kolem 40°C. Správně usušená droga je zelená, bez pachu a má nahořklou, svíravou chuť. Přesušená droga se snadno drolí. Při uložení v suchu a temnu je účinná po dva roky (Andrejev a Barinov, 1990).

3.2.2. Použití v léčitelství

První písemné zmínky o použití jitrocele jako léčivé rostliny pocházejí z asyrské medicíny. I v antické době byl velmi ceněnou léčivkou. Listy jitrocele kopinatého patří díky značnému obsahu slizu k typickým slizovým drogám. Sliz se skládá ze směsi arabogalaktanů, galaktanů a polygalakturonů obsahujících rhamnózu, arabinózu a galaktózu. Za hlavního nositele účinku se dnes obecně považuje glykosid aukubin, jehož aglykon má antibiotické účinky (Jirásek a Starý, 1986).

Dále jitrocel obsahuje biologicky aktivní látky jako polysacharidy, lipidy, deriváty kyseliny kávové, flavonoidy, iridoidové glykosidy, terpenoidy, alkaloidy a organické kyseliny (Samuelsen, 2000).

Droga působí příznivě na odhlehování horních cest dýchacích a na zanícené sliznice. V dětském lékařství je velmi oblíbený jitrocelový sirup proti kašli a jitrocelové pastilky proti chrapotu (Jirásek a Starý, 1986).

V empirickém léčitelství se listy jitrocele používají proti kašli, astmatu, hemoroidům a průjmům a pro první ošetření ran při poranění kůže. Kontraindikace a vedlejší účinky nejsou známy (Mayer et al., 2004).

3.2.3. Další zástupci čeledi jitrocelovitých (*Plantaginaceae*)

Čeď jitrocelovitých zahrnuje více druhů s léčivými účinky. V Rusku a občas i jinde se sbírá a pěstuje i jitrocel větší (*Plantago major* L.), jehož drogu ale náš lékopis nepřipouští (Jirásek a Starý, 1986). Jitrocel větší a prostřední (*Plantago media*) mají však podobné léčivé účinky a jsou také využívány v lidovém léčitelství. I klášterní léčitelství rozlišovalo jitrocel větší a jitrocel kopinatý, přičemž tomu druhému byly přiznávány větší léčebné síly (Mayer et al., 2004).

Dalším zástupcem je jitrocel blešník (*Plantago psyllium*), který bývá řazen do zvláštního rodu *Psyllium* (chmelík) jako *Psyllium afra* (chmelík blešníkový). Jeho droga, *Semen psyllii*, jsou červenohnědá a silně lesklá semena, která obsahují až čtyřnásobné množství slizu ve srovnání s listy jitrocele kopinatého. Výluh z těchto semen působí jako výborné projímadlo s příznivým účinkem na střevní sliznici. Dnes se však pro tyto lékařské účely používá téměř výhradně semeno jitrocele indického (*Plantago ovata*), tzv. indické blešníkové semeno, dovážené ze střední Asie. (Jirásek a Starý, 1986, Mayer et al., 2004).

3.2.4. Obsah fenolických látek

Z druhu jitrocel větší (*Plantago major* L.) bylo izolováno několik flavonoidů a některé z těchto sloučenin mají strukturu, která nebyla dosud publikována.

Tab. č.2 Flavonoidy obsažené v jitroceli větším (*Plantago major* L.)

apigenin 7-glukosid
baikalein
hispidulin
hispidulin 7-glukoronid
homoplantagin
luteolin 7 glukosid
luteolin 7-diglukosid
luteolin 6-hydroxy-4'-metoxy-7-galaktosid
nepetin 7-glukosid
plantagin
skutelarein

(Samuelsen, 2000)

Z jitrocele byl izolován plantagin a homoplantagin. Baikalein, hispidulin, skutelarein a plantagin jsou lapači radikálů a mohou inhibovat peroxidaci lipidů. Baikalein a hispidulin mají protizánětlivé účinky.

Z etanolového extraktu byly izolovány etyl a metylestery kyseliny kávové, zatímco z vodného extraktu kyselina chlorogenová a neochlorogenová. Hlavními deriváty kyseliny kávové obsažené v *Plantago major* L. je plantamajosid a akteosid. Plantamajosid vykazuje protizánětlivé, antibakteriální a antioxidační účinky, působí jako lapač radikálů a inhibuje peroxidaci lipidů (Samuelsen, 2000).



Obr. č.3 Jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata* L.)

3.3. Bez černý

3.3.1. Obecné znaky

Černý bez (*Sambucus nigra* L.), vysoký až sedm metrů, patří do čeledi zimolezovitých (*Caprifoliaceae*). Je to keř, někdy i strom s větvemi vyplněnými bílou, vatovitou dřevinou. Mladé větve jsou zelené, později šedé a mají nápadné čoučkovité jizvy. Řapíkaté, vstřícně postavené listy jsou lichozpeřené, s dvěma až třemi jařmy elipčitých až podlouhlých lístků. Lístky jsou, kromě spodní části u řapíku, zubaté a po rozemnutí páchnou. Malé kvítky se žlutobílou korunou také intenzivně voní. Květy jsou uspořádány do plochých vrcholičnatých květenství.

Plody jsou leskle černé peckovičky, dozrávající od května do října (Andrejev a Barinov, 1990).

Bez černý kvete od června do července a roste ve světlých listnatých lesích, na pasekách a lesních okrajích a v hojnosti druhotně kolem plotů, zdí, na skládkách a rumišťích. Plody bezu černého požírají ptáci a tím šíří tento keř hlavně kolem sídlišť a na kulturních půdách. Zušlechtěné odrůdy se pěstují na plantážích (Kaack a Austed, 1998).

Bez černý je rozšířen po celé Evropě, roste na Kavkaze, v Malé Asii, v Arménii, v Íránu a zasahuje až do západní Sibíře. Jeho semena byla zjištěna již v neolitických sídlišťích člověka. Od starověku byly známy léčivé účinky bezu černého. Staří Slované bez uctívali a věřili v jeho kouzelnou moc, šťávou z plodů barvili nejen látky, ale zdobili jí i tváře dřevěných bůžků (Tříška, 1979).

Bez černý patřil od pradávna k významným léčivým rostlinám a k léčení se užívaly všechny jeho části. V současné době se sbírají především květy (*Flos sambuci*) a plody (*Fructus sambuci*). Sběr květu se provádí ručně odstřihováním celých květenství i se stopkou 1 cm dlouhou v době, kdy všechny květy jsou plně rozvité, ale nikoli překvetlé. Po usušení se květy odtrhnou a stopky odstraní. Dobře usušená droga má jasně žlutou barvu, kořenitě voní a má nasládlou, slizovitou chuť. Při dobrém uložení v suchu a temnu vydrží i tři roky.

Bezinky se na drogu sklízají v celých plodenstvích, rychle se suší zavěšené na drátech a pak odstopkují na sítích. Voní po sušeném ovoci, chutnají sladkokysele až svíravě a slepují se, což však není droze na závadu (Andrejev a Barinov, 1990).

3.3.2. Použití v léčitelství

Bez černý je oficiální léčivkou zařazenou do Českého lékopisu, jeho terapeutické vlastnosti jsou vynikající. Drogy se používají jako prostředky potopudné, protineuralgické, močopudné a projímavé. Horký nálev květní drogy se užívá při onemocnění z nachlazení, horních cest dýchacích, dobře rozpouští hleny a uklidňuje zanícenou sliznici. Má výrazně protikřečový účinek při nemocech střev a močového měchýře.

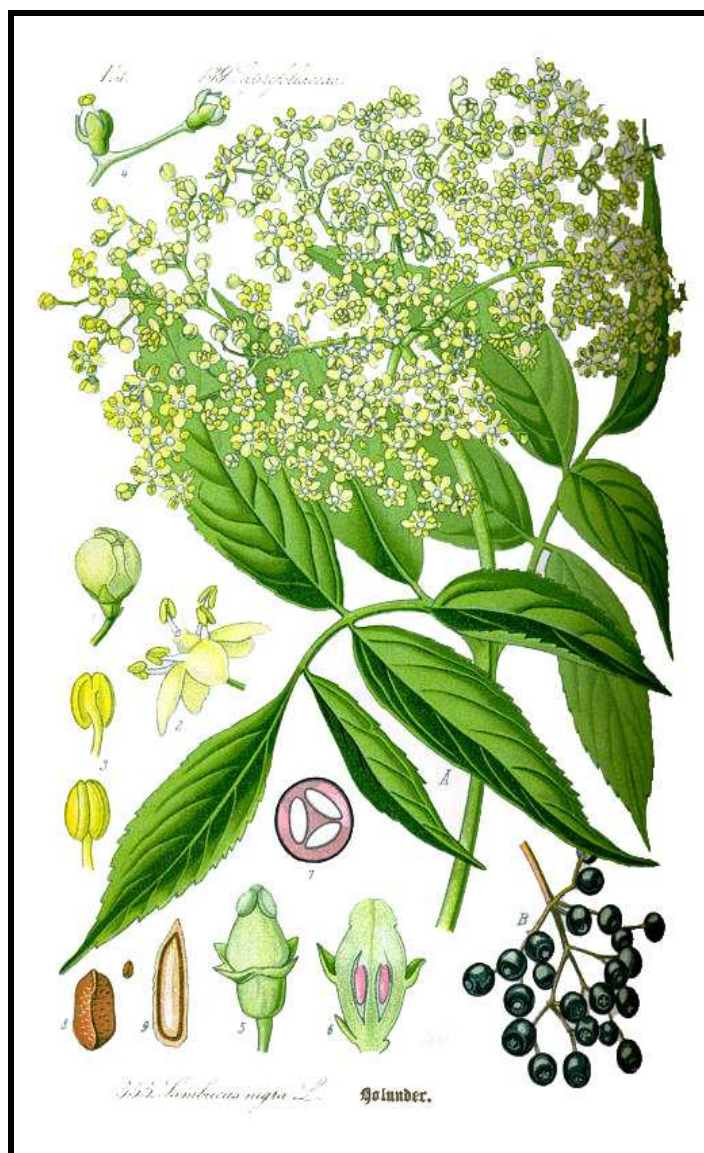
Bezinky se předepisují rovněž v nálevu, a to při léčení chronických zánětů horních cest dýchacích, doprovázených úporným kašlem, při zánětech trojklaného nervu a migrénách a jako doplňková léčba při ischiasu a revmatismu (Jirásek a Starý, 1986).

Kontraindikace a vedlejší účinky nejsou známy (Mayer et al., 2004). Bezinky nelze pojídat za sirova, neboť mohou zvláště v nedozrálém stavu vyvolávat příznaky otrav. Jedovatost je dána obsahem kyanogenních glykosidů (Atkinson a Atkinson, 2002).

3.3.3. Obsažené látky

V květní droze je obsažen rutin (až 3%), kyanogenní glykosid sambunigrin (z druhů rodu *Sambucus* specifický jen pro bez černý), dále izokvercetin, silice, organické kyseliny, cukry, slizy a třísloviny. Bezinková droga obsahuje $\pm 8\%$ invertního cukru sambubiózy, až 1,5 % organických kyselin, vitamin C a barviva antokyaniny a antokyanidiny, z nichž byly zjištěny např. chryzantemin a sambukyan (Jirásek a Starý, 1986).

K ovocné vůni bezinek přispívají alifatické alkoholy a aldehydy a aromatické estery (Atkinson a Atkinson, 2002). Mezi hlavní antokyaniny přítomné v bezinkách patří cyanidin-3-glukosid a cyanidin-3-sambubiosid (Kaack a Austed, 1998).



Obr. č.4 Bez černý (*Sambucus nigra* L.)

3.4. Bříza bělokorá

3.4.1. Obecné znaky

Bříza bělokorá (*Betula pendula* Roth.) patří do čeledi břízovitých (*Betulaceae*). Je to strom se štíhlým kmenem a nápadnou bílou borkou na silnějších větvích v horní části kmene. Bílou barvu borky způsobuje pryskyřičná látka betulin v buňkách kůry. Na spodu kmene je borka hrubá, rozpraskaná a tmavá. Větve jsou přímé, později převislé. Řapíkaté listy mají trojboce srdčitou a na okraji, kromě báze, dvakrát ostře pilovitou čepel, v mládí jsou pýřité a lepkavé. Samčí a samičí květy jsou v jehnědách, plodem je křídlatá nažka (Tříška, 1979).

Bříza bělokorá kvete od dubna do května a roste hojně v podrostu listnatých i jehličnatých lesů. Je rozšířena po celé Evropě a západní Sibiři. V Rusku i ve Finsku tvoří často sama, nebo spolu s osikou a olší, celé velké porosty. Je to velmi skromná dřevina a snáší velmi drsné klimatické i půdní podmínky. Naopak je velmi náročná na světlo.

Rozlišení mezi dvěma druhy bříza bělokorá a bříza pýřitá může být zvláště problematické, protože jednotlivé stromy mají morfologické charakteristiky, které tvoří přechod mezi oběma druhy. Tento problém může být překonán studiem počtu chromozomů jednotlivých stromů (bříza bělokorá $2n = 28$, zatímco bříza pýřitá $2n = 56$) nebo použitím chemické metody dle Lundgrena, která je založena na vytvoření sraženiny se sloučeninami přítomných v kůře břízy bělokoré. V bříze pýřité je tato sloučenina méně hojná a sraženina je tedy slabší. Tyto morfologické problémy mohou být také vyřešeny studiem trichomů a chemického složení flavonoidů, které trichomy různých druhů břízy vylučují (Lahtinen et al., 2006).

3.4.2. Použití v léčitelství

V léčitelství se dnes používá téměř výhradně list břízy, zatímco dříve se používaly i kůra, pupeny a pryskyřice. V listech jsou především flavonoidy, ale i salicylové sloučeniny, vitamin C, třísloviny, hořčiny a pryskyřice. Jejich diuretické působení je vysvětlováno přítomností flavonoidů, přičemž relativně vysoký obsah vitamínu C zřejmě tento účinek podporuje (Mayer et al., 2004).

Březového listu se používá jako prostředku povzbuzujícího ledviny při proplachovací terapii močových cest u bakteriálních a zánětlivých onemocnění a nemocí doprovázených křečemi, ale i k podpůrné léčbě revmatických obtíží. V empirickém léčitelství je bříza oblíbeným a často používaným prostředkem. Čaj z březového listí se pije při revmatismu, dně, ledvinových kamenech a kožních onemocněních. Tinktura z pupenů tohoto stromu se používá při horečce, žaludečních obtížích a zevně jako prostředek na hojení ran.

3.4.3. Obsah fenolických látek

K analýze flavonoidů a dalších fenolů vyskytujících se v bříze bělokoré (*Betula pendula*) a bříze pýřiré (*Betula pubescens*) byla použita metoda HPLC (Keinänen a Julkunen-Tiitto, 1998). Flavonoidní glykosidy obsažené v bříze bělokoré a bříze pýřité byly zkoumány v několika studiích týkajících se farmakologie, chemotaxonomie a ekologie. Obecně jsou flavonoidy považovány za chemotaxonomické ukazatele, neboť vykazují širokou strukturní rozmanitost a jsou chemicky stabilní. V mnoha případech jsou flavonoidy používány k ujasnění již existujících klasifikačních systémů. Blízká příbuznost mezi výskytem některých flavonoidních aglykonů a počtem chromozomů druhů *Betula* ukazuje, že oba tyto chemotaxonomické ukazatele mohou být užiteční v taxonomické a fylogenetické analýze (Lahtinen et al., 2006).

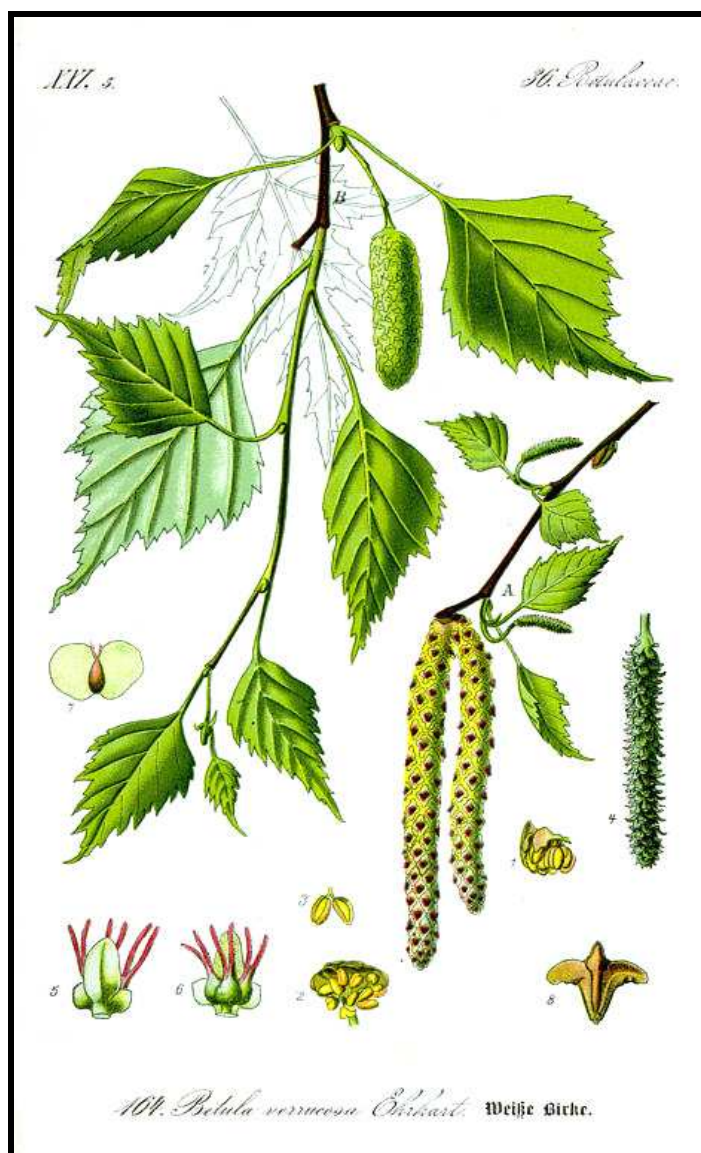
Po kyselé hydrolýze byly určeny flavonoidní aglykony pomocí HPLC. Cukerné zbytky byly identifikovány plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií. Flavonoidní glykosidy byly určeny jako ekvivalenty kvercetin-3-galaktosidu.

Tab č.3 Obsah fenolických sloučenin v listech břízy bělokoré (*Betula pendula* Roth.)

Sloučenina	Obsah (mg/kg sušiny)
kyselina neochlorogenová	0,6
kyselina chlorogenová	2,7
deriváty kyseliny <i>p</i> -kumarové	3,2
katechin	0,6
myricetin-3-galaktosid	2,6
myricetin-3-glukuronid	0,5
myricetin-3-arabinopyranosid	0,1
myricetin-3-arabinofuranosid	0,6
myricetin-3-rhamnosid	0,2
kvercetin-3-galaktosid	8,0
kvercetin-3-glukosid	0,3
kvercetin-3-glukuronid	2,2
kvercetin-3-arabinopyranosid	1,6
kvercetin-3-arabinofuranosid	2,2
kvercetin-3-rhamnosid	0,8
kempferol-3-glykosid	0,1
kempferol-3-glukuronid	0,2
glykosidy kempferolu	0,3
kempferol-3-rhamnosid	0,2
deriváty apigeninu	0,8
deriváty luteolinu	0,1

(Keinänen a Julkunen-Tiitto, 1998)

Široké množství sloučenin bylo identifikováno jako konjugáty myricetinu, kempferolu a kvercetinu. Velmi hojnou fenolickou sloučeninou je kyselina chlorogenová. Dále byly určeny další deriváty kyseliny skořicové jako kyselina neochlorogenová, kyselina kávová a *p*-kumarová (Keinänen a Julkunen-Tiitto, 1998).



Obr. č.5 Bříza bělokorá (*Betula pendula* Roth.)

3.5. Meduňka lékařská

3.5.1. Obecné znaky

Meduňka lékařská (*Melissa officinalis* L.) je trvalka, která může dorůst až do výšky jednoho metru. V zemi vytváří vícehlavý oddenek s četnými, až 30 cm dlouhými kořeny. Má bohatě větvenou lodyhu s vejčitými, na okrajích pilovitými listy. Květy jsou umístěny v úžlabí listů, většinou na horní části lodyhy. Koruna květů je narůžovělá až namodralá (Heneberg, 1992).

Meduňka patří do čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Latinský název *Melissa* má svůj původ v řeckém slově „meliteia“, od „meli, melitos“- med, a vypovídá o atraktivnosti rostliny pro včely. Termín „officinalis“ k názvu přiřadil Carl von Linné (1707-1778). Význam francouzského slova „officine“, který znamená „lékárnický, laboratorní“ byl poprvé zdokumentován v roce 1812. Jméno „balm“, používané v angličtině, je zkrácená podoba pro „balzám“, nejdůležitější ze sladce vonících olejů.

Meduňka pochází ze západní Asie a východního Středomoří. Vyskytuje se též v jihozápadní Sibiři a v severní Africe. Ve střední Evropě neroste ve volné přírodě, ale je zde pěstována. Kvete od července do srpna, před kvetením listy citronově voní. Nejvíce užívanou částí jsou sušené listy, často mající rozkvetlé vrcholy (Herodež et al., 2003).

3.5.2. Použití v léčitelství

Tato bylinka je používána k léčbě mnoha onemocnění. Extrakt má významné antioxidační účinky. Publikované výsledky potvrzují, že antioxidační aktivita je způsobena obsahem fenolických kyselin, především kyseliny rozmarýnové, která byla nalezena ve velkém množství léčivek (Žiaková et al., 2003). Čaj z meduňky je v léčitelství doporučován jako nápoj při neurologicky podmíněných zažívacích potížích a poruchách spánku, proti hysterii a melancholii, při chronickém průduškovém nachlazení, migréně, bolesti zubů, hlavy, ucha a při vysokém krevním tlaku. Také výborně desinfikuje močové cesty. Zevně se používá na zmírnění revmatismu, při nervovém vypětí a při strnulosti šije. Uklidňujících účinků meduňkové silice se využívá i v přísadách do koupele a v mastech (Mayer et al., 2004, Herodež et al., 2003).

3.5.3. Obsah fenolických látek

Určením kvalitativního a kvantitativního složení hlavních aromatických a polyfenolických sloučenin pomocí HPLC se zabývali Carnat a kol. Studie srovnává obsah těchto sloučenin v sušených listech, čaji a v listech zbylých po nálevu.

Rostlinný materiál (1 kg sušených listů) byl zakoupen v obchodě a byla potvrzena totožnost druhu officinalis. Materiál byl vysušen horkým vzduchem při teplotě 30 – 35 °C a uchován v papírovém sáčku při pokojové teplotě po dobu tří měsíců. Nálev byl připraven zalitím 10 g celých listů 1 l destilované vody a louhován po dobu 15 minut. Výsledný nálev měl žlutou barvu a příjemnou citrónovou vůni. Složení polyfenolických sloučenin bylo analyzováno pomocí HPLC s připojením DAD.

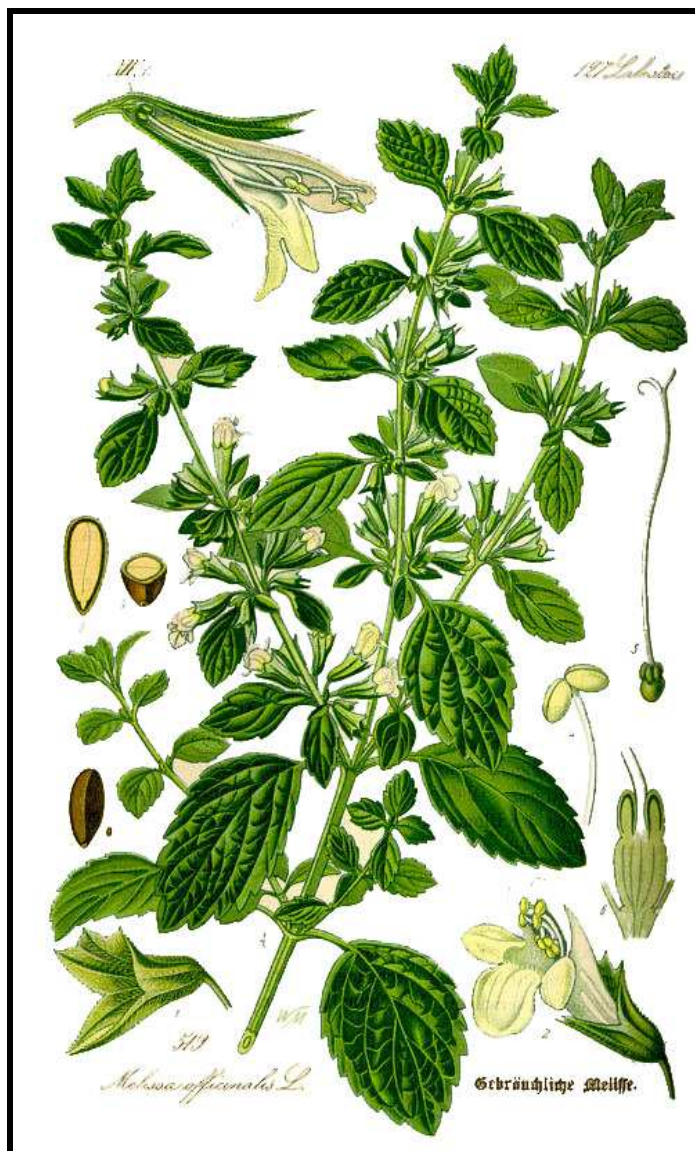
Výsledky studie ukazují, že sušené listy obsahují 0,32 % silice, ze které citral (neral + geranial) tvoří 0,13 %. Celková separace polyfenolů činí 11,8 % a zahrnuje deriváty kyseliny hydroxyskořicové (11,3 %), z toho obsah kyseliny rozmarýnové činí 4,1 %. Obsah flavonoidů je 0,5 %. Čaj z meduňky obsahuje 31 % původní silice. Důvodem tohoto poměru je poměrně vysoká hladina aldehydů a citralu. Listy zbylé po nálevu obsahují 0,12 % silice a jsou ochuzené o citral (Carnat et al., 1998).

Tab. č.4 Obsah hlavních sloučenin v sušených listech, čaji a listech zbylých po nálevu z meduňky lékařské

Složky	Obsah hlavních sloučenin (v % váhy sušiny)		
	sušené listy	čaj	listy zbylé po nálevu
silice	0,32	0,10	0,12
citronellal	0,13	0,02	0,05
β -karyofylen	0,01	0	0,01
neral	0,07	0,03	0,02
geranial	0,09	0,04	0,02
souhrn flavonoidů	0,51	0,44	0,11
deriváty luteolinu	0,54	0,51	0,07
deriváty kyseliny hydroxyskořicové	11,29	10,49	1,86
kyselina rozmarýnová	4,05	3,99	0,33

(Carnat et al., 1998)

Kyselina rozmarýnová má antivirové a antioxidační vlastnosti, zatímco silice působí antimikrobiálně a proti křečím. Farmaceutické preparáty, které obsahují extrakt obohacený o kyselinu rozmarýnovou brání replikaci viru herpes a tím potlačují tvorbu oparů (Carnat et al., 1998).



Obr. č.6 Meduňka lékařská (*Melissa officinalis* L.)

3.6. Řepík lékařský

3.6.1. Obecné znaky

Řepík lékařský (*Agrimonia eupatoria* L.) je vytrvalá bylina z čeledi růžovitých (*Rosaceae*). Z dřevnatého oddenku vyrůstá až jeden metr vysoká, drsně chlupatá lodyha, zakončená dlouhým, klasovitým květenstvím. Listy jsou přetrhovaně lichožpeřené, s lístky vejčitými, pilovitými, na rubu šedě chlupatými. Drobné, sytě žluté květy jsou uspořádané do štíhlých hroznů. Rostlina kvete od června do září. Plod je nažka obalená šešulí s háčkovitými výrůstky.

Druh je rozšířen po celé Evropě, roste i v Asii i Severní Americe. Ve volné přírodě roste hojně na suchých stanovištích, v lučních a pastevních porostech, na mezích, v příkopech a na lesních paloucích. Vzhledem ke zvýšené poptávce se řepík nejen sbírá, ale také pěstuje. Mezi uznané odrůdy patří řepík Krajový. Je možné ho pěstovat na velkých plochách s použitím mechanizace při sklizni. Tento způsob však poskytuje drogu horší jakosti.

K léčebným účelům se sbírá nať, která po zpracování poskytuje významnou drogu *Herba agrimoniae*. Získává se seřezáváním celých rostlin na počátku kvetení. Nesbírají se rostliny překvetlé a lodyhy silnější než pět milimetrů. Správně sušená droga kořenitě voní a má nahořklou chuť. Nemá se skladovat déle než dva roky (Andrejev a Barinov, 1990).

3.6.2. Použití v léčitelství

Účinné látky působí svíravě, protizánětlivě, žlučopudně a močopudně. Léčivý čaj z řepíku, případně ve směsi s bylinami podobného působení, se používá k léčení zažívacích poruch, proti průjmům a k pomocnému léčení nemocí jater a ledvin. Nálev se připravuje z jedné lžice řezané drogy, která se přelije asi dvěma šálky vroucí vody. Po vyluhování a scezení se nápoj užívá po jednom šálku dvakrát až třikrát denně. Čaj je i chutným nápojem.

Droga je také součástí některých hromadně vyráběných léčivých přípravků. Při zevním použití se využívají protizánětlivé a hojivé účinky (kloktadla, koupele, ústní vody) nejen v lékařství, ale i v léčebné kosmetice. Používání řepíku lékařského v lékařství i lidovém léčitelství natolik významné, že patří rozsahem spotřeby mezi nejdůležitější drogy států střední Evropy (Jirásek a Starý, 1986).

3.6.3. Obsah fenolických látek

Ke stanovení polyfenolů obsažených v extraktu z řepíku lékařského byla použita jak metoda HPLC s připojením k DAD, tak hmotnostní spektrometrie. Technika HPLC byla použita pro selektivní detekci flavan-3-olů. Důležité informace byly získány kombinací dat získaných z těchto dvou technik.

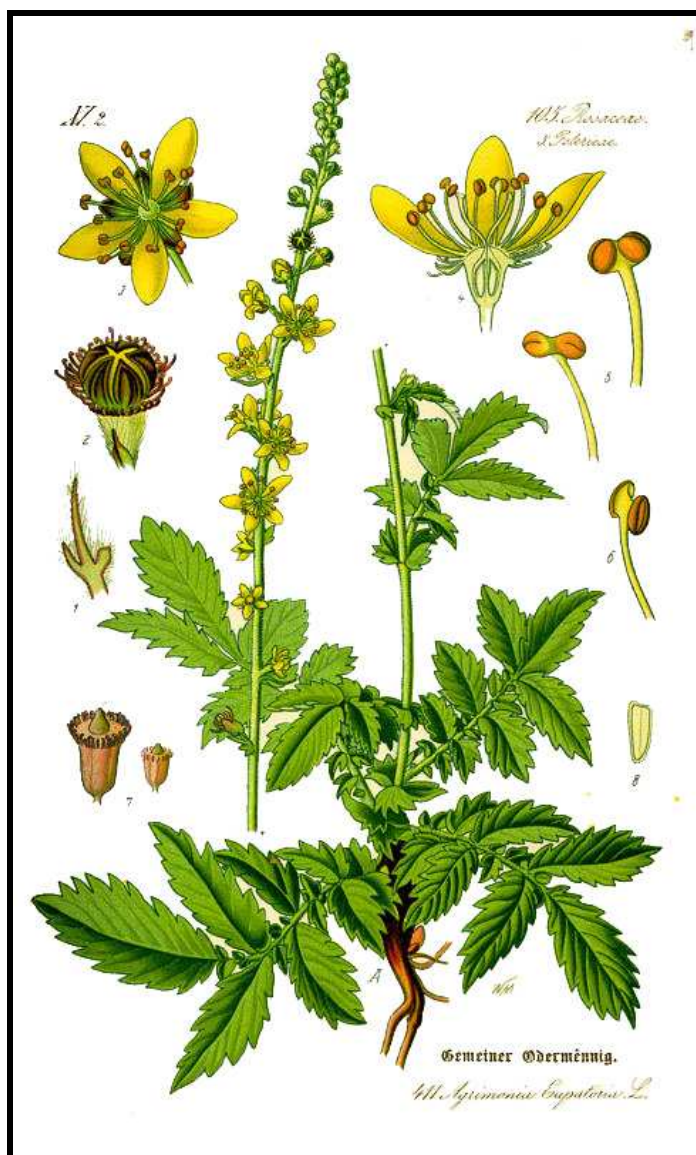
HPLC profil ukazuje na přítomnost těchto polyfenolů: nejvýznamnější z flavan-3-olů je přítomnost monomeru katechinu a dimerů, trimerů a tetramerů procyanidinu. Dále byly identifikovány deriváty apigeninu a deriváty kvercetinů jako je hyperosid a izokvercetin a deriváty kempferolu (tilirosid). Tyto sloučeniny mají cenné antioxidační a protizánětlivé účinky. Polyfenoly pravděpodobně přispívají k velmi významné antioxidační kapacitě, která je přibližně dvakrát větší než u askorbové kyseliny (Correia et al., 2006).

V semenech řepíku byl také nalezen kvercetin 3'-O-β-D-glukopyranosid (Tomlinson et al., 2003)

Tab. č.5 Fenolické látky zjištěné v řepíku lékařském (*Agrimonia eupatoria* L.)

katechin
kyselina <i>p</i> -kumarová
apigenin 6-C-glukosid (izovitexin)
kvercetin 3-O-galaktosid (hyperosid)
kvercetin 3-O-glukosid (izokvercetin)
kvercetin 3'-O-β-D-glukopyranosid
kempferol 3-O-glukosid
kempferol 3-O-(6''-O- <i>p</i> -kumaroyl)-glukosid (tilirosid)

(Correia et al., 2006, Tomlinson et al., 2003)



Obr. č.7 Řepík lékařský (*Agrimonia eupatoria* L.)

3.7. Kontryhel obecný

3.7.1. Obecné znaky

Kontryhel obecný (*Alchemilla vulgaris* L.), patřící do čeledi růžovitých (*Rosaceae*), je vytrvalá bylina s krátkým oddenkem a přízemní růžicí listů, lysá až huňatá (s různým stupněm chlupatosti i na různých částech rostlin). Lodyhy jsou listnaté, vystoupavé až přímé, 5 - 50 cm vysoké, vyrůstající z oddenku po straně listové růžice. Přízemní listy jsou řapíkaté, s tuhou, okrouhlou, šedo zelenou dlanitolaločnatou čepelí. Květenství je bohaté, vrcholičnaté, složené z vidlanů, jejichž poslední větve přecházejí ve vijany. Drobné čtyřčetné květy mají žlutozelené až zelené zbarvení. Jednotlivé květy mají kalich ze čtyř lístků, které naspodu srůstají v číšku stejně velikou nebo větší než volné části lístků. Pod kalichem je ještě kalíšek, jehož lístky jsou větší než kalich. Koruna není vyvinuta. Plodem je nažka.

Kontryhel se hojně vyskytuje na vlhkých loukách, v příkopech, na pastvinách, okrajích lesů, na sutích, u potoků a cest od pahorkatiny až do hor (až alpský stupeň). Rostlina je rozšířena v Evropě a západní Asii, v severní Africe ve vysokém Atlasu, v Americe pouze v jihovýchodní Kanadě. Zavlečeně a zdomácněle se vyskytuje i v USA a Austrálii.

Drogou jsou listy přízemní růžice s řapíky (*Folium alchemillae*) nebo kvetoucí nať (*Herba alchemillae*) (Andrejev a Barinov, 1990).

3.7.2. Použití v léčitelství

Kontryhel byl v lidovém léčitelství používán k léčení tzv. ženských onemocnění, při nadměrném krvácení při menstruaci, proti potratu a k ulehčení klimakterických potíží. Další oblastí lidového použití byly poruchy zažívání provázené průjmy, záněty močových cest a zevně jako kloktadlo, na oční lázně, na obklady proti zánětům a na zdlouhavě se hojící rány. Dnešní lékařství používá drogy kontryhele jen zřídka. Reálné je využití drogy v antidiabetických čajových směsích. Zařazení kontryhele do terapie je závislé na podrobnějším chemickém a farmakologickém výzkumu rostliny (Jirásek a Starý, 1986).

3.7.3. Obsažené látky

Účinky drogy jsou podmíněny obsahem katechinových tříslovin, kterých bylo nalezeno až 8 %. Dále obsahuje flavony, izoflavony, flavonoly a málo známé doprovodné látky. Pro účinek jsou důležité zejména hořčiny, které mají mírně stahující (astringentní) účinky (Mayer et al., 2004).



Obr. č.8 Kontryhel obecný (*Alchemilla vulgaris* L.)

3.8. Popenec břechťanovitý

3.8.1. Obecné znaky

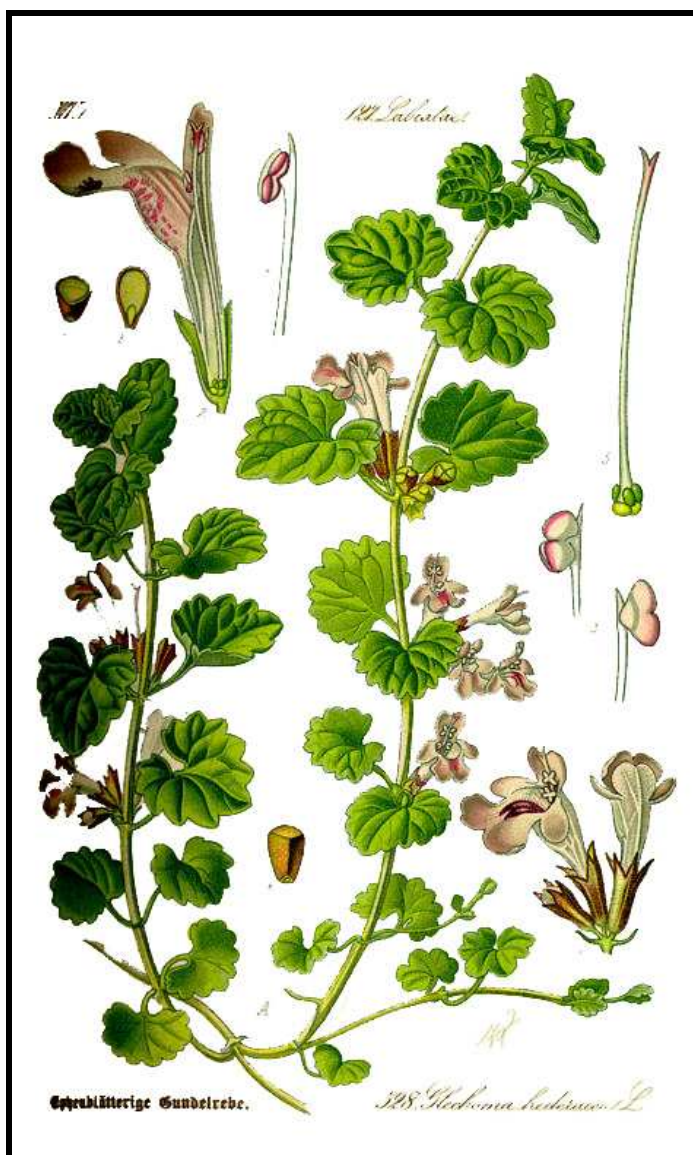
Popenec břechťanovitý (*Glechoma hederacea* L.) je vytrvalá, plazivá bylina z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*). Tenké, plazivé oddenky přecházejí ve vystoupavé, čtyřhranné, lysé lodyhy, dorůstající výšky až 30 cm. Z uzlů vyrůstají i dlouhé, zakořeňující výhony, kterými se rostlina šíří do okolí. Listy jsou vstřícné, řapíkaté s čepelí ledvinitou až srdčitou, hrubě vroubkovanou. V úžlabí horních listů vyrůstají řídké lichopřesleny pyskatých květů modrofialové barvy. Rostlina kvete od března do července. Plody jsou tvrdky.

Popenec je rozšířen po celé Evropě a v Asii. Roste na stinných, vlhkých místech na zahrádkách, v živých plotech, v křovinách a v lesích.

K léčebným účelům se sbírá nať, která po usušení poskytuje drogu *Herba glechomae*. Nať se sbírá ručně seřezáváním celých rostlin od dubna až do července. Pak se suší ve stínu, na suchém, dobře větraném místě a občas se obrací (Andrejev a Barinov, 1990).

3.8.2. Použití v léčitelství

Droga má všestranné léčebné použití. Popenec napomáhá při léčení horních cest dýchacích, k uvolňování hlenů, k tlumení záchvatu kašle a při plicních chorobách. Výtažky z popence podporují tvorbu a vylučování žaludečních šťáv a tvorbu žluče. Obsah tříslovin podmiňuje svíravý a protizánětlivý účinek, který se uplatňuje při léčení žaludečních a střevních katarů a průjmů.



Obr. č.9 Popenec břečťanovitý (*Glechoma hederacea* L.)

3.8.3. Obsažené látky

Z obsahových látek jsou důležité třísloviny, hořčina glichomin, silice, cholin, organické kyseliny a minerální látky (Andrejev a Barinov, 1990).

3.8.4. Obsah fenolických látek

Podrobné informace o obsahu fenolických látek v kontryhelu obecném a popenci břechťanovitém nebyly v literatuře nalezeny anebo nebyly publikované odborné články dostupné.

4. ANALYTICKÉ METODY

Pro analýzu flavonoidů jsou vhodné ty metody, které umožňují dělení pestrých směsí látek podobného charakteru. Pro tento účel se nejlépe osvědčila vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforéza (CE) a její modifikace micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC).

Analytika flavonoidních sloučenin se dělí na oblast kvalitativní, která se zajímá o zjištění zastoupení všech flavonoidních látek v daném materiálu a oblast kvantitativní, kdy je zjišťován obsah buď jednotlivých flavonoidů nebo celkové množství vybraných látek v testovaném materiálu. Také může být stanovován celkový obsah jednotlivých flavonoidních aglykonů. Toto stanovení vyžaduje hydrolýzu všech přítomných glykosidických forem jednotlivých aglykonů (Dadáková, 2006).

4.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie zahrnuje všechny chromatografické způsoby separace, kdy je mobilní fáze kapalná. S ohledem na experimentální uspořádání hovoříme o kapalinové chromatografii v otevřeném systému (papírová a tenkovrstvá chromatografie) a v uzavřeném systému (dnes zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC).

HPLC je pro stanovení flavonoidů nejčastěji využívanou metodou (Hertog et al., 1992a, Hertog et al., 1992b, Hollman et al., 1996, Carnat et al., 1998, Tomlinson et al., 2003, Papp et al., 2004, Correia et al., 2006, Lahtinen et al., 2006).

Mobilní fáze je při isokratické eluci vedena ze zásobníku přes odplyňovač do vysokotlakého čerpadla, při gradientové eluci se komponenty mobilní fáze přivádějí ze zásobníku do směšovače, kde se programově mísí ve zvoleném poměru a teprve pak postupují do čerpadla. Odtud je mobilní fáze vedena přes tlumič pulsů čerpadla do kolony. Kolona bývá obvykle vyrobena z nerez oceli či speciálního skla a bezprostředně za ni je připojen detektor. Ten je spojen se zařízením pro registraci průběhu analýzy (zapisovač, či dnes takřka výhradně PC s hardwarovou úpravou s vyhodnocovacím software). Někdy bývá za detektor zařazen tzv. sběrač frakcí mobilní fáze, jenž umožňuje zachytit separovanou složku vzorku, např. pro následnou detailní identifikaci. Pro dávkování vzorku je nyní zcela převažujícím způsobem nástřik vzorku s použitím tzv. šesticestného kohoutu s dávkovací smyčkou. Smyčka o známém konstantním objemu se nejprve naplní vzorkem, poté se kohout přepne do druhé polohy, kdy eluent protéká smyčkou a vnese vzorek do kolony. Pro HPLC se používají rovné kolony o délce 10 až 100 cm (nejčastěji 10 až 20 cm), s vnitřním průměrem od 0,2 do 2 cm. Při dělení složitějších směsí se někdy kolony řadí za sebou. U přírodních vzorků, jež obsahují

mnoho balastních látek, jež by mohly vyvolat předčasné znehodnocení kolony, se často před vlastní kolonou zařazuje ochranná předklonka. Včasnou výměnou předklonky chráníme separační kolonu. Kolony pro HPLC jsou dnes plněny výhradně profesionálně, velikost zrn sorbetu se pohybuje mezi 3 až 50 μm , nejčastěji mezi 5 až 10 μm . Pro detekci je velmi rozšířen průtokový fotometrický či fluorimetrický detektor. Eluát protéká měrnou celou malého objemu s velkou optickou délkou (obvykle $V = 5$ až 10 μm , $l = 10$ mm). Při vhodné volené vlnové délce je registrována absorbance eluátu. Moderní přístroje jsou vybaveny detektory s proměnlivou a programově měnitelnou vlnovou délkou či tzv. diode array detektorem, schopným proměřit ve zvoleném okamžiku celé UV/VIS spektrum složky. Získaná informace je důležitým kvalitativním údajem o sledované složce (Drbal a Křížek, 1999).

4.2. Kapilární elektroforéza (CE)

První separace flavonoidů na kapilární elektroforéze byla provedena v roce 1991 Piettem a kol., kteří ji použili pro rozdělení a identifikaci flavonoidních glukosidů (Haleem, 1997). Tato metoda je pro stanovení flavonoidů méně využívána, běžnější je kombinace CE a HPLC (Rhodes a Price, 1997).

Kapilární elektroforézu řadíme mezi elektromigrační metody. Elektromigrační metody zaujímají stále významnější místo mezi separačními analytickými technikami. Využívají rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyblivost nabitých částic závisí na velikosti náboje, velikosti a tvaru molekul, podmínkách prostředí, ve kterých separace probíhá, a na síle použitého elektrického pole. Elektromigrační techniky se praktikují v kapalně fázi, obvykle ve vodných roztocích.

Je-li částice, nesoucí náboj Q umístěna do stejnosměrného pole o intenzitě E [$\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$], působí na ni síla F_1 .

$$F_1 = z e E = Q E \quad z - \text{udává náboj iontu}$$

Tato síla uvádí ion do pohybu. Proti ní však působí odpor prostředí silou F_2 , která je přímo úměrná rychlosti částice v .

$$F_2 = -6 \pi \eta r v = -k \eta v \quad \begin{array}{l} \eta - \text{značí viskozitu roztoku} \\ r - \text{značí poloměr iontu} \\ k - \text{značí konstantu úměrnosti} \end{array}$$

Za ustáleného stavu jsou obě síly v rovnováze.

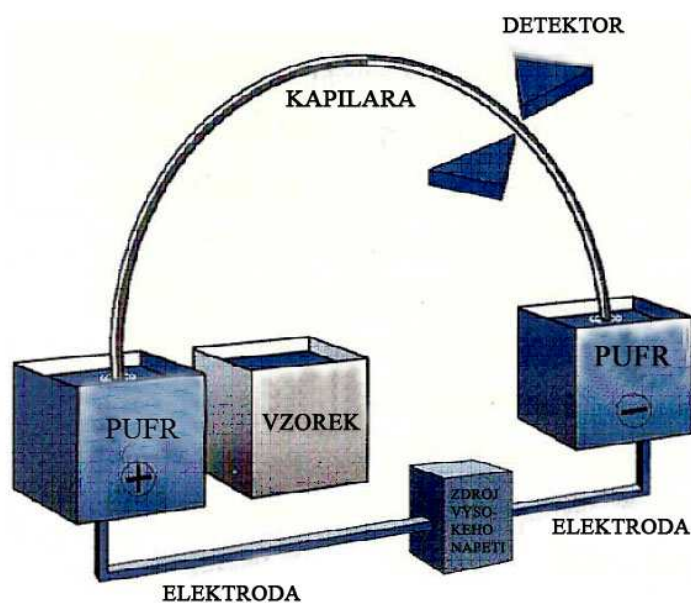
$$v = (Q/(k \eta)) E = u E \quad u - \text{je pohyblivost částice} [\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$$

Každá volná elektricky nabitá částice se v elektrickém poli pohybuje ve směru daném znaménkem jeho náboje a orientací elektrického pole. Rychlost tohoto pohybu je závislá jednak na náboji částice, jednak na odporu prostředí. Je zřejmé, že méně objemné částice s větším nábojem se budou pohybovat rychleji než částice objemné nesoucí pouze malý náboj. Tuto vlastnost popisuje veličina nazývaná elektroforetická pohyblivost, která vyjadřuje rychlost pohybu částice nebo iontu v jednotkovém elektrickém poli (Dolník, 1994).

4.2.1. Varianty kapilární elektroforézy

Zařízení pro kapilární elektroforézu se skládá ze dvou elektrod umístěných do rezervoárů elektrolytu, obvykle do tlumivého roztoku (Drbal a Křížek, 1999). Vysokonapěťový zdroj vytváří elektrické pole nutné pro separaci. Separace probíhá v kapiláře, která je ponořena do elektrodových nádobek. Na distálním konci kapiláry je umístěn detektor, který snímá analytický signál. Analytický signál je zapsán liniovým zapisovačem nebo dále zpracován počítačem (obr.č.2).

Obrázek č.10 Schéma kapilární elektroforézy



Rozlišujeme čtyři varianty kapilární elektroforézy. Jsou to zónová elektroforéza, izotachoforéza, micelární elektrokinetická chromatografie a izoelektrická fokusace. Separační principy jsou u jednotlivých variant dost odlišné: zatímco v zónové elektroforéze a izotachoforéze dochází k separaci na základě rozdílů efektivních pohyblivostí

a v elektrokinetické micelární chromatografii na základě rozdílů rozdělovacích koeficientů mezi mobilní a pseudostacionární fází, jsou v izoelektrické fokusaci separandy od sebe odděleny na základě rozdílů v izoelektrických bodech (Dolník, 1994).

4.2.2. Kapilární zónová elektroforéza

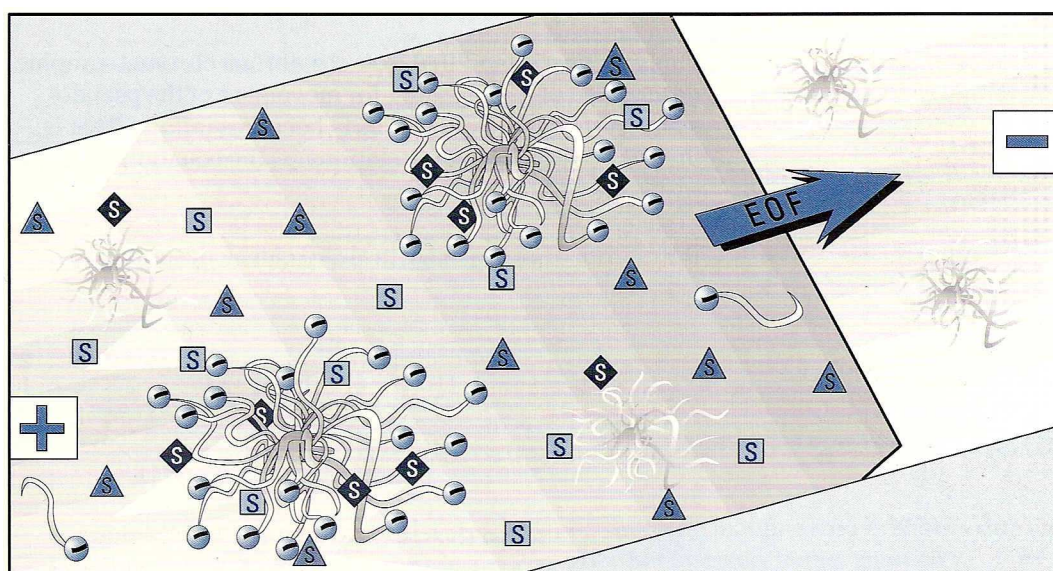
Na principu klasické elektroforézy je založena kapilární zónová elektroforéza (KZE), také nazývaná vysokoúčinná kapilární elektroforéza (HPCE) (Drbal a Křížek, 1999). Pro tuto metodu je charakteristické použití jednoho pracovního elektrolytu v celém separačním systému. V důsledku toho je v celé separační kapiláře konstantní elektrické pole. Jednotlivé zóny putují stále stejnou rychlostí, takže se v průběhu separace od sebe stále více vzdalují. Vlivem difúze se zónová rozhraní s časem rozmývají (Dolník, 1994).

Při kapilární zónové elektroforéze jsou rezervoáry s tlumivým roztokem propojeny kapilárou vyplněnou rovněž tlumivým roztokem. Běžné kapiláry užívané v KZE mají vnitřní průměr 24 - 75 μm , délka se pohybuje od 15 cm do 100 cm a jejich povrch není nijak upravován. Kapiláry jsou vyrobeny ze syntetického křemene a před mechanickým poškozením jsou chráněny polyamidovou vrstvou. Další významnou vlastností křemenných kapilár je existence elektroosmotického toku kapaliny (pufu) kapilárou. Vnitřní kapilární povrch se chová jako slabě kyselý katex. Při $\text{pH} > 2$ dochází s růstem pH ke stále významnějšímu nahrazování H^+ iontů na vnitřním kapilárním povrchu za jiné (nejčastěji Na^+) ionty, které jsou běžnou složkou tlumivého roztoku. Kationy (Na^+) migrují ke katodě a vzhledem ke své hydrataci strhávají s sebou roztok v kapiláře. Proudění toku kapaliny kapilárou vyvolanému tímto jevem říkáme elektroosmotický tok (EOT). Tento tok je při $\text{pH} 2$ téměř nulový a se vzrůstem pH se zvyšuje. V běžných elektroforetických systémech je ve srovnání a rychlostí běžných iontů rychlost EOT dominantní. Jak kationty, tak anionty jsou tedy během analýzy unášeny ke katodě, neboť výsledná rychlost pohybu aniontů i kationtů je dána vektorovým součtem jejich migrační rychlosti v a rychlosti pohybu EOT. Do kapiláry je na jejím anodovém konci zaveden vzorek (1 - 10 μl). Při napětí 10 – 30 kV dochází v kapiláře k elektroosmotickému toku, kterým jsou jak kationty, tak anionty transportovány směrem k detektoru. Během této cesty však dochází k jejich vzájemné separaci. O kvalitě dělení rozhoduje zejména délka kapiláry, rychlost EOT, pohyblivost dělených iontů, jež je u protolytů závislá na pH roztoku a teplotě, při níž separace probíhá (Drbal a Křížek, 1999).

4.2.3. Micelární elektrokinetická chromatografie

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) nebo též micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC) umožňuje využít KZE i pro separaci elektroneutrálních (nenabitých) látek. U této metody je v tlumivém roztoku rozpuštěna povrchově aktivní látka (tenzid) v tzv. nadkritické koncentraci. Velmi často se používá dodecylsulfát sodný. Při nadkritické koncentraci ($10\text{--}20\text{ mmol.l}^{-1}$) dochází v roztoku k tvorbě micel. Hydrofobní konce tenzidu jsou obráceny dovnitř micely, hydrofilní (a nabitá) část molekuly tenzidu (micely) je přitom nasměrována do roztoku. Mezi volnými molekulami tenzidu a molekulami tenzidu vázanými do micely existuje dynamická rovnováha, takže micely se v roztoku neustále tvoří a rozpadají. Nenabitě organické látky mohou interagovat s micelami. Zejména polarita látky rozhodne, jak dlouho se bude příslušná složka vzorku v hydrofobním jádře micely zdržovat. Čím méně polární bude látka, tím déle a častěji se bude vyskytovat uvnitř micel a jelikož nabitě micely putují kapilárou dle zákonitostí KZE, budou se s nimi pohybovat též elektroneutrální látky. Pokud se látka ocitne mimo micelu, bude unášena pouze EOT. K separaci technikou MEKC tedy dochází díky nestejně četnosti a míře interakcí dělených elektroneutrálních látek se systémem micel v tlumivém roztoku. Micelární systém v kapiláře se nazývá pseudostacionární fáze (Drbal a Křížek, 1999).

Obrázek č.11 Separace na MEKC



EOF = elektroosmotický tok

S = látka rozpuštěná v roztoku (solut)

Protože se obvykle v MEKC vyžaduje výrazný elektroosmotický tok, je pH udržováno v neutrální a alkalické oblasti. Přidávky kovů mají vliv na povrchový náboj micely. Častěji

než v zónové elektroforéze je zde přídavek nevodných rozpouštědel: změna solvatace ovlivňuje micelární strukturu a interakce mezi solutem a micelou. Pro jemnější nastavení separačních podmínek se někdy vytvářejí i smíšené micely (např. dodecylsulfát a oktylsulfát), kdy nastavením vhodného koncentračního poměru obou tenzidů lze cíleně optimalizovat podmínky pro separaci (Dolník, 1994).

II. CÍLE PRÁCE

Z provedené literární rešerše vyplynulo, že léčivé rostliny obsahují řadu fenolických látek, mezi nimiž svými biologickými vlastnostmi vynikají flavonoly s hlavním zástupcem kvercetinem. Tato látka má výrazné antioxidační účinky a může působit při prevenci vzniku onemocnění srdce a cév. Rutin (kvercetin-3-O-D-rutinosid) je nejznámějším glykosidem kvercetinu. Je majoritním glykosidem v některých léčivých rostlinách, např. v bezu černém.

Pro stanovení celkového kvercetinu a rutinu byla zvolena metoda kapilární elektroforézy. Pro stanovení obsahu vybraných fenolických látek byla zvolena metoda HPLC. Pro tuto práci byl použit lyofilizovaný a volně sušený materiál, analýze byl podroben soubor 8 léčivých rostlin.

Řešení bylo zaměřeno na následující cíle:

- stanovit obsah celkového kvercetinu v souboru léčivých rostlin
- stanovit obsah rutinu v souboru léčivých rostlin
- porovnat obsah celkového kvercetinu a rutinu v lyofilizovaném a volně sušeném materiálu
- zjistit zastoupení vybraných fenolických látek v léčivých rostlinách metodou HPLC a porovnat výskyt těchto látek v jednotlivých léčivkách
- porovnat metody CE a HPLC

III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. ODBĚR A SKLADOVÁNÍ VZORKŮ

Pro analýzu vybraných fenolických látek bylo zvoleno 8 druhů léčivých rostlin běžně používaných v České Republice. Z toho bylo pět druhů volně rostoucích a tři pěstované.

Tab. č.6 Odebírané byliny

bez černý	<i>Sambucus nigra</i> L.
bříza bělokorá	<i>Betula pendula</i> Roth.
jitrocel kopinatý	<i>Plantago lanceolata</i> L.
kontryhel obecný	<i>Alchemilla vulgaris</i> L.
meduňka lékařská	<i>Melissa officinalis</i> L.
popenec břečťanovitý	<i>Glechoma hederacea</i> L.
řepík lékařský	<i>Agrimonia eupatoria</i> L.
tužebník jilmový	<i>Filipendula ulmaria</i> L.

Materiál pro analýzu byl získán sběrem z volně rostoucích kultur v květnu a červnu 2005. Lokalita sběru se nacházela v intravilánu města České Budějovice (Česká Republika) asi 500 m od nejbližší frekventované komunikace. Materiál byl sbírán za slunečného bezvětřného dne, postup při odběru vzorků odpovídal zásadám doporučeným v literatuře (Korbelář a Endris, 1985). Bylo vždy odebráno kolem 500 – 700 g čerstvé rostliny.

Bylinný materiál z pěstovaných druhů léčivek (meduňka, řepík, jitrocel) byl odebrán v červenci 2005 z kultur rostoucích na pokusném pozemku PF JU. Tyto léčivky byly vypěstovány z osiva uznaných odrůd (meduňka Citra, řepík Krajový, jitrocel Libor).

Bezprostředně po sběru byl materiál upraven pro účely analýz, to znamená, že rostliny byly rozděleny na menší části (0,5 cm) a vzorek byl zhomogenizován promícháním. Celý vzorek byl rozdělen na dva díly. Jeden díl byl sušen volně a druhý byl určena k lyofilizaci.

Materiál určený k lyofilizaci byl bezprostředně po zpracování zmrazen a během jednoho měsíce lyofilizován. Lyofilizace probíhala při teplotě - 46°C a tlaku 0,015 mbar po dobu 24 hodin. Materiál určený k volnému sušení byl rozprostřen v jedné vrstvě na filtrační papír v místnosti s teplotou 22 °C. Sušení trvalo sedm dnů a bylo ukončeno po dosažení konstantní hmotnosti.

Všechny usušený (tj. oběma způsoby) materiál byl homogenizován na laboratorním mlýnku a uchováván v uzavřené plastové vzorkovnici při teplotě - 16°C až do analýzy.

2. STANOVENÍ OBSAHU CELKOVÉHO KVERCETINU A RUTINU METODOU MECC

2.1 Chemikálie a standardy

methanol, kyselina boritá, kyselina chlorovodíková, hydroxid sodný, hydrogenuhličitan sodný (vše Lachema, Brno)

dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma Chemicals Corporation, USA)

tetraboritan sodný (borax) (Fluka, Švýcarsko)

kyselina askorbová (Merck, Německo)

kvercetin (Aldrich, Německo)

kyselina 1-naftyloctová (Spolana, Neratovice)

Všechny použité chemikálie měly analytickou čistotu.

Pro všechny práce byla používána demineralizovaná voda, která byla připravena na zařízení firmy Premier (USA).

2.2 Příprava roztoků

Zásobní roztoky standardu kvercetinu o koncentraci 1 mg/ml a vnitřního standardu kyseliny 1-naftyloctové o koncentraci 2 mg/ml byly připravovány ve 100 % methanolu. Tyto roztoky byly skladovány v temnu při teplotě 4 °C a používány pro ředění standardních roztoků dle potřeby.

Roztok pracovního borátového pufru se skládal z 10 mM boraxu, 10 mM kyseliny borité a 15 % methanolu (v/v) a pracovní borátový pufr s SDS obsahoval 10 mM boraxu, 10 mM kyseliny borité, 20 mM SDS a 15 % methanolu (v/v).

K promývání kapiláry byly připravovány 0,1 M roztok kyseliny chlorovodíkové a 1 M a 0,1 M roztoky hydroxidu sodného.

Jako ředící roztok byl používán 5 % methanol (v/v) ve vodě. Hodnota pH byla upravena na 3,5 pomocí 1 M HCl.

2.3 Laboratorní sklo a přístroje

sada laboratorního skla

technické váhy Kern (Německo)

analytické váhy AB 204 Mettler (Švýcarsko)

lyofilizátor Alpha 1-2 Christ (Německo)
kombinovaná lednice Bosch (Německo)
termostatovaná vodní lázeň MLW 8 (Německo)
odstředivka MLW T 52,1 (Německo)
pH-metr InoLab WTW (Německo)
filtrační zařízení Sigma – Aldrich (Steinheim/Německo)
filtry ze skleněných vláken GF/C Whatman (Velká Británie)
zařízení na SPE extrakci (vývojové dílny JU)
kolonky SPE Merck Li Chrolut RP – 18 (Německo)
automatická pipeta Finnpipette BioControl Labsystems (Helsinki/Finsko)
tepl vzdušná sušárna ULM Memmert (Německo)
kapilární elektroforéza Spectraphoresis TM 2000 Thermo Separation Products (USA)

2.4. Metodika stanovení

Pro stanovení obsahu flavonoidu kvercetin a rutinu byla používána analytická metoda, která byla vyvinuta na pracovišti, kde jsem zpracovávala diplomovou práci. Metoda vycházela z publikované práce (Dadáková et al., 2001) a byla modifikována pro potřeby stanovení obsahu kvercetin a rutinu v léčivých rostlinách.

Publikovaná metoda vychází z původních prací vyvinutých pro stanovení vybraných flavonoidů metodou HPLC (Hertog et al., 1992b). Na jejich základě byla vypracována metoda zpracování biologického vzorku, která se hodí pro analýzu pomocí kapilární elektroforézy. Pro účely kapilární elektroforézy musí být vzorek předčištěním zbaven balastních doprovodných látek. Vzhledem k malému objemu vzorku, který je přístrojem použit k vlastní analýze, je nutno analyt maximálně zakoncentrovat.

Používaná metoda se skládá z kyselé hydrolyzy veškerých glykosidů přítomných ve vzorku. Dále následuje úprava vzorku odstředěním, filtrací a ředěním. Sorpce analytu se provádí na kolonkách SPE a analytická koncovka metodou kapilární elektroforézy v uspořádání s micelotvornou látkou (MECC).

2.4.1. Stanovení celkového kvercetin v lyofilizovaných a sušených vzorcích bylin

Flavonol kvercetin představuje nejběžnější druh flavonoidního aglykonu. V rostlinném materiálu je vždy vázán v glykosidické formě na molekulu některého sacharidu. Volný kvercetin se vyskytuje velmi zřídka a bývá uvolněn z glykosidické formy nejčastěji

enzymovou aktivitou přítomných mikroorganismů. Každý rostlinný materiál obsahuje více druhů glykosidů a stanovit obsah jednotlivých látek by bylo analyticky obtížné. Jedním z důvodů je to, že nejsou k dispozici potřebné standardy. Je proto výhodnější kvercetin uvolnit ze všech glykosidických forem a stanovit sumu celkového kvercetinu. Tato hodnota pak podá představu o obsahu kvercetinových glykosidů v materiálu.

Navážka asi 0,25 g lyofilizovaného zhomogenizovaného materiálu, váženého na analytických vahách s přesností na 0,1 mg byla vložena do 100 ml varné baňky s 12,5 ml methanolu, 7,5 ml vody, 80 mg kyseliny askorbové a 5 ml 6 mol.l⁻¹ HCl. Tato směs byla hydrolyzována 2 hodiny pod zpětným chladičem v termostátované vodní lázni při teplotě 85°C. Hydrolyzovaný vzorek byl po vychlazení neutralizován 2 g Na HCO₃, převeden do odstředivací kyvety a odstředěn (15 minut, 3500 otáček za minutu). Sediment byl resuspendován pomocí 12,5 ml methanolu a 25 ml vody a odstředěn za stejných podmínek. Postup odstředování byl opakován ještě jednou s použitím 37,5 ml vody. Spojené supernatanty byly shromažďovány v 600 ml kádince, doplněny na objem 200 ml vodou a kyselost roztoku byla upravena na hodnotu pH = 3 nasyceným roztokem NaHCO₃. Roztok byl přefiltrován za sníženého tlaku přes filtr ze skleněných vláken GF/C (Whatman, Velká Británie), a filtrát byl poté kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Tento roztok byl použit pro SPE na kolonkách. Zachycené látky byly eluovány pomocí 1,4 ml methanolu do měrné vialky. Do vialky byl přidán roztok vnitřního standardu kyseliny 1-nyfityloctové v methanolu (objem 0,1 ml, koncentrace 2 mg/ml v methanolu).

2.4.2. Stanovení rutinu v lyofilizovaných a sušených vzorcích bylin

Rutin (kvercetin-3-O-D-rutinosid) je nejběžnějším kvercetinovým glykosidem a vyskytuje se v mnohých rostlinných druzích. Při jeho stanovení postačí extrakce z rostlinného materiálu pomocí organického rozpouštědla.

Navážka asi 0,25 g lyofilizovaného zhomogenizovaného materiálu, váženého na analytických vahách s přesností na 0,1 mg, byla vložena do 100 ml varné baňky s 12,5 ml methanolu, 12,5 ml vody a 80 mg kyseliny askorbové. Tato směs byla extrahována 1 hodinu pod zpětným chladičem v termostátované vodní lázni při teplotě 90°C. Extrahovaný vzorek byl po vychlazení převeden do odstředivací kyvety a odstředěn (15 minut, 3500 otáček za minutu). Sediment byl resuspendován pomocí 12,5 ml methanolu a 25 ml vody a odstředěn za stejných podmínek. Postup byl opakován ještě jednou s použitím 37,5 ml vody. Spojené supernatanty byly shromažďovány v 600 ml kádince, doplněny do 200 ml vodou a kyselost roztoku byla upravena na hodnotu pH = 3 pomocí roztoku HCl o koncentraci 1 mol.l⁻¹. Roztok byl přefiltrován za sníženého tlaku přes filtr ze skleněných vláken GF/C (Whatman,

Velká Británie) a filtrát byl poté kvantitativně převeden do 500 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Tento roztok byl použit pro SPE na kolonkách. Zachycené látky byly eluovány pomocí 1,4 ml methanolu do měrné vialky. Do vialky byl přidán roztok vnitřního standardu kyseliny 1-nyftyloctové v methanolu (objem 0,1 ml, koncentrace 2 mg/ml v methanolu).

2.4.3. Měření na kapilární elektroforéze

Připravené roztoky byly měřeny na kapilární elektroforéze s použitím borátového pracovního pufru o složení 10 mM tetraboritanu sodného, 10 mM kyseliny borité, 20mM SDS a 15 % (v/v) methanolu, pH = 9,2. Pracovní napětí přístroje bylo 20 kV a pracovní teplota 25 °C. Analyt (rutin nebo kvercetin) se odečítal při 270 nm. Mez stanovitelnosti byla 10 mg/kg pro rutin i kvercetin.

Jako analytická odezva byl použit poměr ploch píků kvercetinu a vnitřního standardu. Kvantifikace obsahu kvercetinu byla provedena pomocí kalibrační závislosti. Roztoky pro sestavení kalibrační závislosti byly připravovány ze zásobních roztoků standardů v methanolu. Výtěžnost kvercetinu a rutinu z materiálu byla stanovena pro každý vzorek zvlášť metodou standardního přídávku. Rozšířená nejistota postupu s koeficientem rozšíření 2 byla odhadnuta z rozboru dílčích nejistot jednotlivých kroků metody a činí 15 % pro celý postup.

3. STANOVENÍ VYBRANÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK METODOU HPLC

3.1. Příprava extraktu

Pro přípravu extraktu z lyofilizovaných nebo volně sušených bylin bylo použito 0,25 g rozemletého zhomogenizovaného materiálu. Vzorek byl extrahován pomocí 3 ml 90 % methanolu po dobu 30 minut při laboratorní teplotě za stálého protřepávání. Po následné centrifugaci (3500 otáček za minutu, po dobu 10 minut) byl odebrán supernatant a sediment byl resuspendován ještě dvakrát v 1 ml 90 % methanolu. Poté byly všechny supernatanty spojeny a byl odečten objem.

3.2. Identifikace vybraných fenolických látek metodou HPLC

Všechny extrakty byly měřeny na kapalinovém chromatografu HP 1050 (Hewlett-Packard, USA) s připojením na DAD detektor (HP 1040, Hewlett-Packard, USA). K analýze byla použita kolona Phenomenex Luna C 18 (2), 3 μ m, 2 x 150 mm.

Mobilní fáze se skládala ze dvou složek :

A: 5 % acetonitril a 0,15 % kyseliny trifluoroctové (v/v)

B: 80 % acetonitril a 0,15 % kyseliny trifluoroctové (v/v)

3.3. Schéma použitého gradientu

Nejprve bylo použito 5 % B na 35 % B během 55 minut, poté od 35 % B do 60 % B po dobu 5 minut při průtoku 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku byl 5 μ l při pracovní teplotě 25 °C.

Během analýzy bylo měřeno spektrum všech látek v rozsahu 190 až 600 nm. Sledované fenolické látky byly identifikovány srovnáním naměřeného spektra se spektrem standardu. V případě nejistoty byla použita metoda standardního přídávku, která látku jednoznačně identifikovala.

IV. DISKUSE A ZÁVĚR

1. Diskuse

Flavonoidy jsou látky polyfenolické povahy výhradně rostlinného původu. Výzkumy v této oblasti stále více potvrzují jejich příznivé účinky na lidský organismus. Mají výrazné antioxidační vlastnosti, zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály vazbou do chelátů a inaktivují některé prooxidační kovové ionty. Díky těmto vlastnostem může konzumace potravin nebo užívání léčivých bylin se zvýšeným obsahem flavonoidů snižovat riziko civilizačních chorob. Flavonoidy mohou být přijímány pouze v potravě a z tohoto důvodu má velký význam stanovování jejich obsahu v různých rostlinných materiálech.

Protože flavonoidy představují bohatou skupinu sloučenin, lze předpokládat, že každý přírodní materiál bude obsahovat směs několika druhů těchto látek. Stanovení každé z nich bylo velmi obtížné, zejména pro nedostupnost standardních materiálů. Všechny flavonoidy se vyskytují v rostlinném materiálu jako O-glykosidy. Kyselou hydrolýzou dochází k rozštěpení glykosidických vazeb ve flavonoidních sloučeninách a k uvolnění aglykonů (Dadáková et al., 2001). Flavonoidy obsahují jen několik typů aglykonů a nejčastějším z nich je kvercetin. Rutin (kvercetin-3-O-D-rutinosid) je nejběžnějším kvercetinovým glykosidem, který se v rostlinném materiálu vyskytuje.

Tato práce byla zaměřena hlavně na stanovení obsahu celkového kvercetinu a obsahu rutinu v léčivých rostlinách běžně využívaných v České Republice. Pro stanovení byla použita metoda MECC, která byla vyvinuta na pracovišti, kde jsem zpracovávala diplomovou práci (Dadáková et al., 2001). Výhodou použité metody je její jednoduchost. Tato metoda také nevyžaduje složité aparatury. Další velkou výhodou je to, že je zapotřebí pouze malé množství rozpouštědel a na organickou analýzu je poměrně jednoduchá. Výsledky získané touto metodou mají vyhovující reprodukovatelnost.

Pro stanovení obsahu dalších fenolických látek v léčivých rostlinách byla použita metoda HPLC s připojením k DAD. Takto byly identifikovány fenolické kyseliny jako je kyselina kumarová, chlorogenová a kávová, a také katechin, rutin, kvercetin a blíže neurčené deriváty kvercetinu nebo jiného flavonolu.

Materiál použitý pro tento výzkum byl většinou získán sběrem z volně rostoucích kultur v intravilánu města České Budějovice. V případě meduňky, řepíku a jitrocele byl použit materiál z pěstovaných uznaných odrůd léčivek (meduňka Citra, řepík Krajový, jitrocel Libor). Tyto léčivky byly vypěstovány na pokusném pozemku PF JU.

1.1. Stanovení obsahu celkového kvercetinu

Analýze byl podroben soubor 8 léčivěk běžně využívaných v České Republice. Pro tuto práci byl použit lyofilizovaný a volně sušený materiál. Výsledky této analýzy byly sestaveny do tabulky (Tab. č.7)

Tab. č.7 Obsah celkového kvercetinu v lyofilizovaných a volně sušených léčivkách

Druh léčivky	Obsah celkového kvercetinu (mg/kg sušiny) v léčivce	
	lyofilizované	volně sušené
tužebník jilmový	14200	14800
bříza bělokorá	11800	10800
bez černý	9640	9770
kontryhel obecný	5380	5120
řepík lékařský	4380	4110
popenec břečťanovitý	3460	3582
jitrocel kopinatý	332	310
meduňka lékařská	236	250

Nejvyšší obsah kvercetinu byl nalezen v tužebníku jilmovém, bříze bělokoré a bezu černém. Obsah celkového kvercetinu v materiálu z tužebníku jilmového a břízy bělokoré nebyl v literatuře dosud publikován. Obsah celkového kvercetinu podle Wach et al. (2007) dosahuje hodnoty pouze 7,9 mg/kg suchého materiálu. To je podstatně méně než hodnota uvedená v této práci. Autoři používají zcela jinou izolační techniku a jiné podmínky hydrolýzy.

Prostřední výsledky obsahu kvercetinu vykazuje kontryhel obecný, řepík lékařský a popenec břečťanovitý. V jitroceli kopinatém a meduňce lékařské bylo nalezeno nejmenší množství. Vzhledem k odhadovanému dennímu příjmu flavonoidů, který činí 1 g/den (Hertog et al., 1992b), je zjištěný obsah kvercetinu v léčivých rostlinách velmi příznivý. Z toho vyplývá, že léčivky mohou nejen pomáhat při běžných onemocněních a potížích různého charakteru, ale jsou i velmi cenným zdrojem kvercetinu.

V porovnání výsledků obsahu celkového kvercetinu v lyofilizovaném a volně sušeném materiálu jsou hodnoty prakticky stejné vzhledem k uváděné nejistotě měření, která činí 15 %. U volně sušených léčivěk nedochází k poklesu obsahu celkového kvercetinu. To znamená, že tato metoda, která je nejběžnější, nejpoužívanější a nejméně náročná na provedení, je pro sušení léčivěk vhodná.

1.2. Stanovení obsahu rutinu

Nejběžnějším glykosidem kvercetinů je rutin (kvercetin-3-O-D-rutinosid). Vyskytuje se v mnohém rostlinném materiálu, ale zdaleka není tolik rozšířený jako kvercetin. Rutin byl zjištěn pouze v několika léčivkách. Výsledky byly sestaveny do tabulky (Tab. č.8).

Tab. č. 8 Obsah rutinu v některých léčivkách

Druh léčivky	Obsah rutinu (mg/kg sušiny) v léčivce	
	lyofilizované	volně sušené
bez černý	17700	17600
popenec břečťanovitý	5690	5710
kontryhel obecný	3600	3730
tužebník jilmový	3010	2960

Nejvyšší obsah rutinu byl zjištěn v bezu černém a popenci břečťanovitém. Bez černý obsahuje zcela výjimečné množství rutinu, které se dá srovnat pouze s pohankou setou (Lachman et al, 2000). Stanovený obsah rutinu odpovídá také hodnotám uvedeným v literatuře (Dawidowicz et al., 2003). Vysoké množství rutinu obsahují i kontryhel obecný a tužebník jilmový. U dalších léčivých rostlin bylo množství rutinu pod mezí stanovitelnosti.

Rozdíly hodnot obsahu rutinu v lyofilizovaném a volně sušeném materiálu jsou zanedbatelné. Při volném sušení tedy nedochází k degradaci flavonoidních glykosidů.

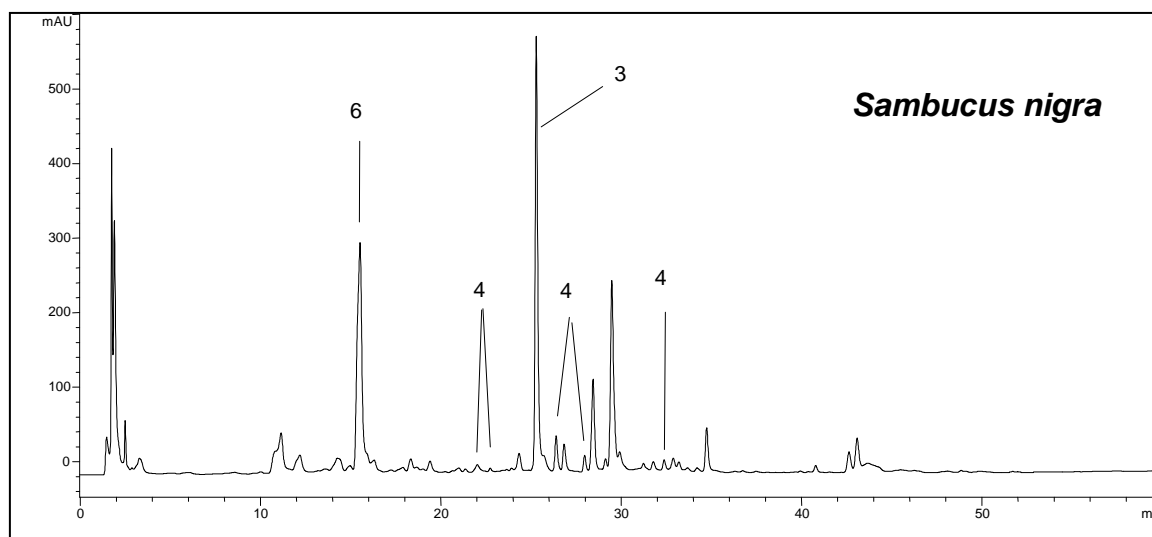
1.3. Chromatografické profily jednotlivých léčivek

Zastoupení různých fenolických látek v léčivých rostlinách bylo zjištěno metodou HPLC s připojením k DAD. Fenolické látky byly identifikovány srovnáním naměřeného spektra se spektrem standardu.

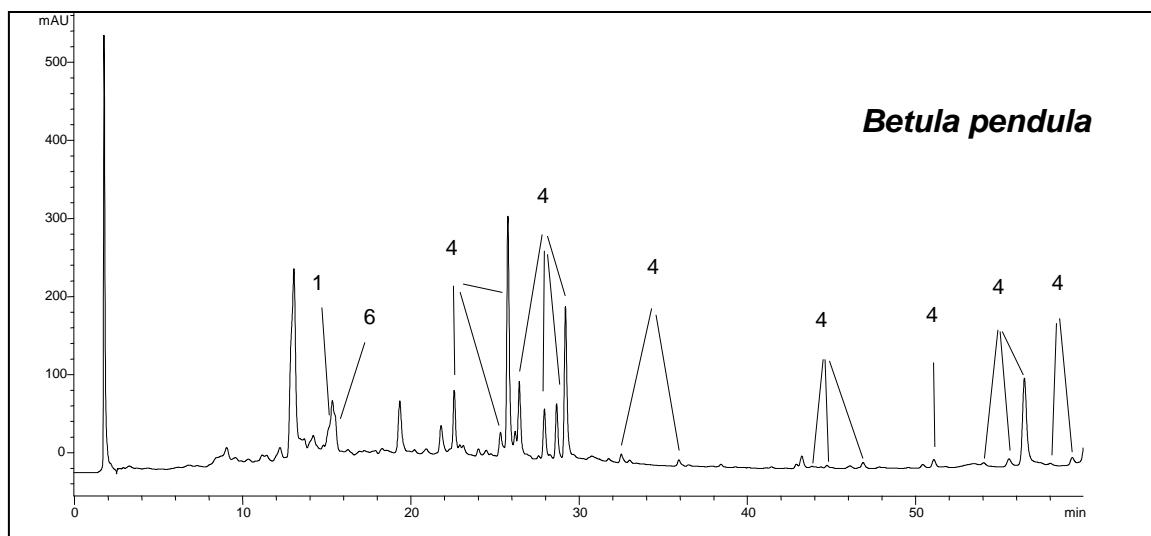
Profily léčivek byly měřeny pro lyofilizovaný i volně sušený materiál a jsou totožné. Následující tabulka udává přehled identifikovaných fenolických látek a číselné označení jejich píků na chromatogramu (Tab. č.9).

Tab. č.9 Fenolické látky identifikované metodou HPLC

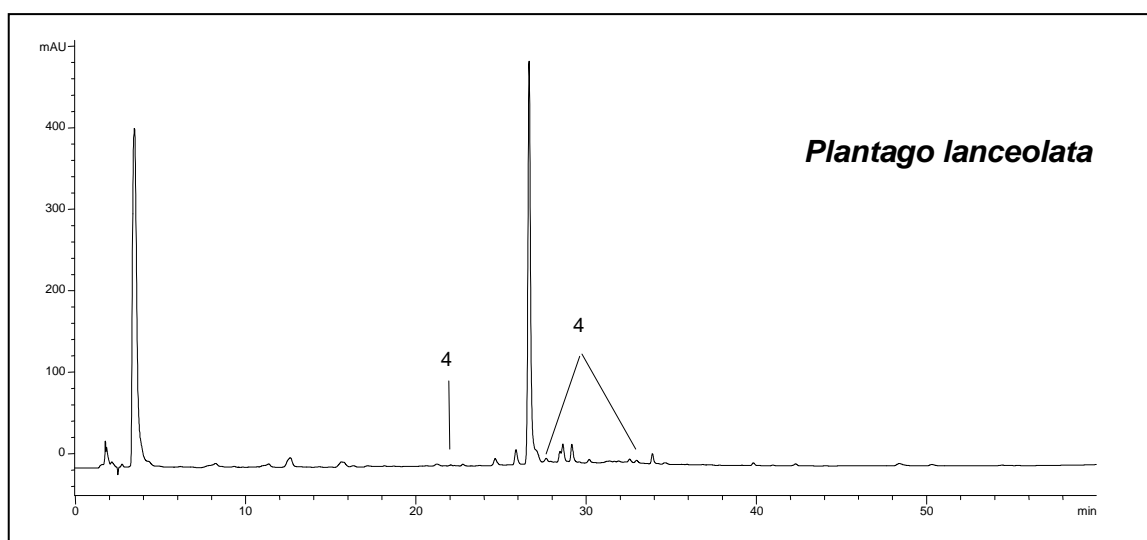
Číslo píku	Fenolická sloučenina
1	katechin
2	kyselina kumarová
3	rutin
4	derivát kvercetinu nebo jiného flavonolu
5	kvercetin
6	kyselina chlorogenová
7	kyselina kávová

Obr. č12 Záznam analýzy bezu černého

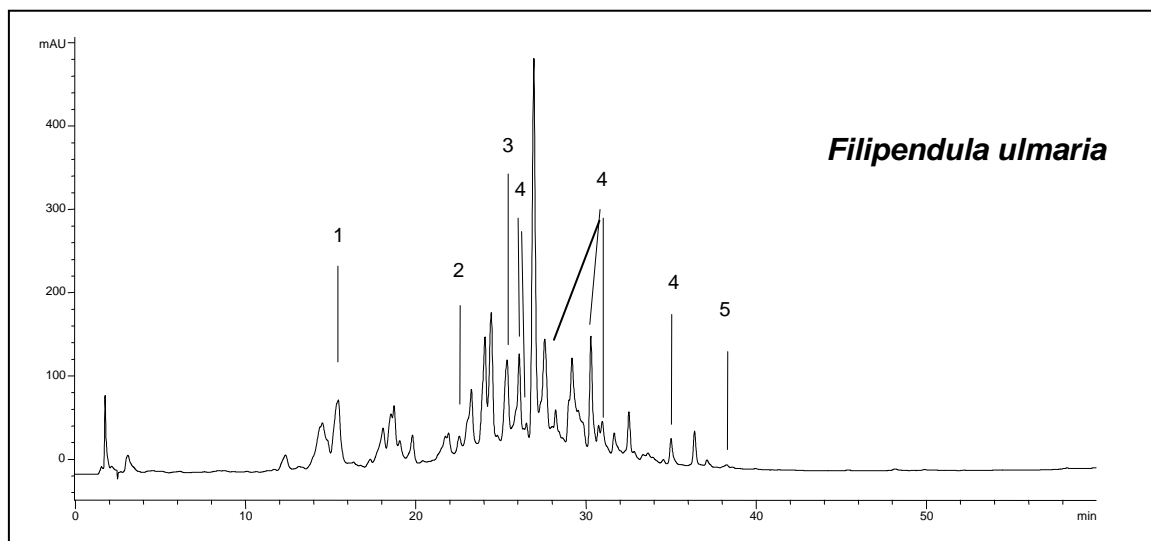
V bezu černém byla zjištěna kyselina chlorogenová (pík č.6). Vetší množství píků (č.4) označují přítomnost derivátů kvercetinu nebo jiných flavonoidů. Chromatogram také potvrzuje přítomnost rutinu (pík č.3), který byl stanoven i metodou MECC.

Obr. č.13 Záznam analýzy břízy bělokoré

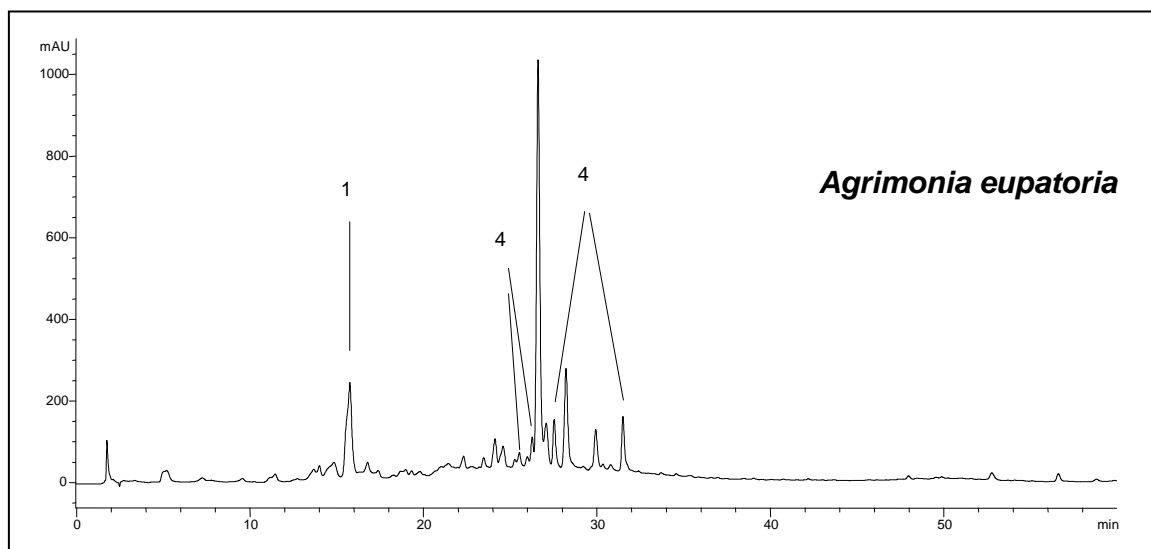
Bříza bělokorá obsahuje tyto fenolické látky: katechin (pík č.1), kyselinu chlorogenovou (pík č.6) a široké spektrum derivátů kvercetinu nebo jiných flavonolů (píky č.4). Literatura toto zjištění potvrzuje, v bříze bělokoré byly identifikovány konjugáty myricetinu, kemoferolu a kvercetinu. Navíc se v této léčivce vyskytují deriváty kyseliny *p*-kumarové a kyselina kávová (Keinänen a Julkunen-Tiitto, 1998), které na chromatogramu chybí. Jejich množství se pravděpodobně pohybuje pod mezí stanovitelnosti.

Obr. č.14 Záznam analýzy jitrocele kopinatého

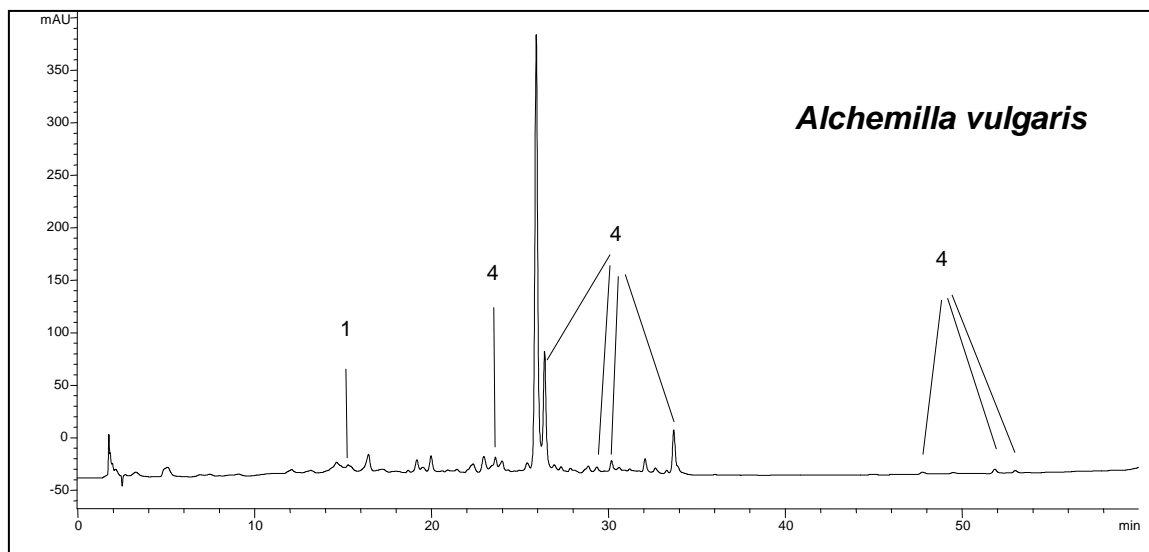
Chromatogram z analýzy jitrocele kopinatého ukazuje přítomnost derivátů kvercetinu nebo jiných flavonolů (píky č.4). Protože zahraniční studie (Samuelsen, 2000) zmiňují pouze obsah fenolických látek v jitroceli větším (*Plantago major* L.), nemohou být výsledky porovnány.

Obr. č.15 Záznam analýzy tužebníku jilmového

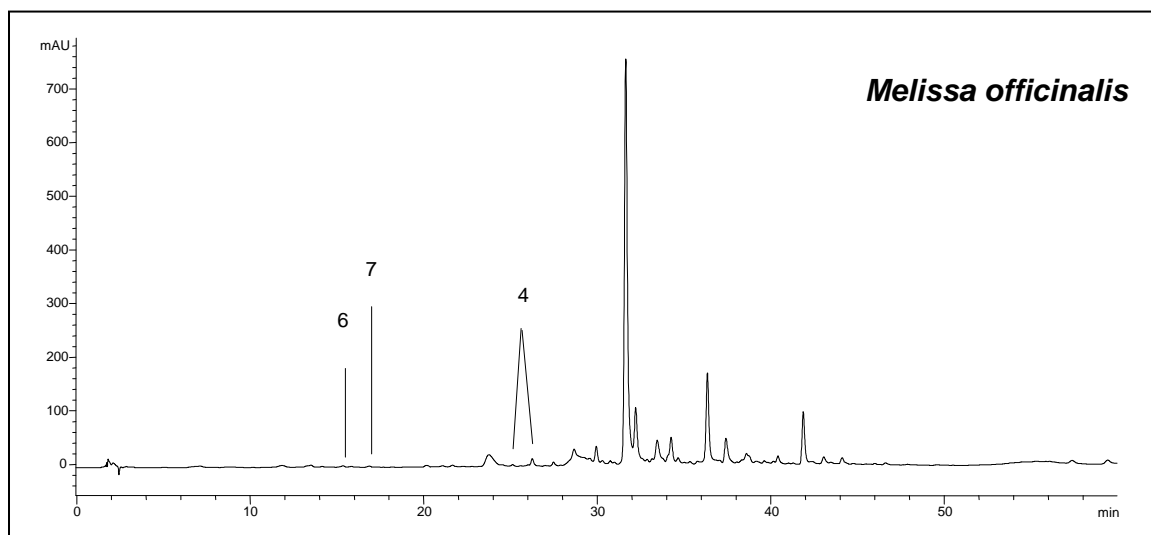
Záznam z analýzy tužebníku jilmového poskytuje velké množství píků, které označují deriváty kvercetinů nebo jiného flavonolu (píky č.4), katechin (pík č.1) a kyselinu kumarovou (pík č.2). Výskyt těchto sloučenin v léčivce je v souladu se zahraničními studii (Krasnov et al., 2006). Dále byl detekován rutin (pík č.3) a kvercetin (pík č.5).

Obr. č.16 Záznam analýzy řepíku lékařského

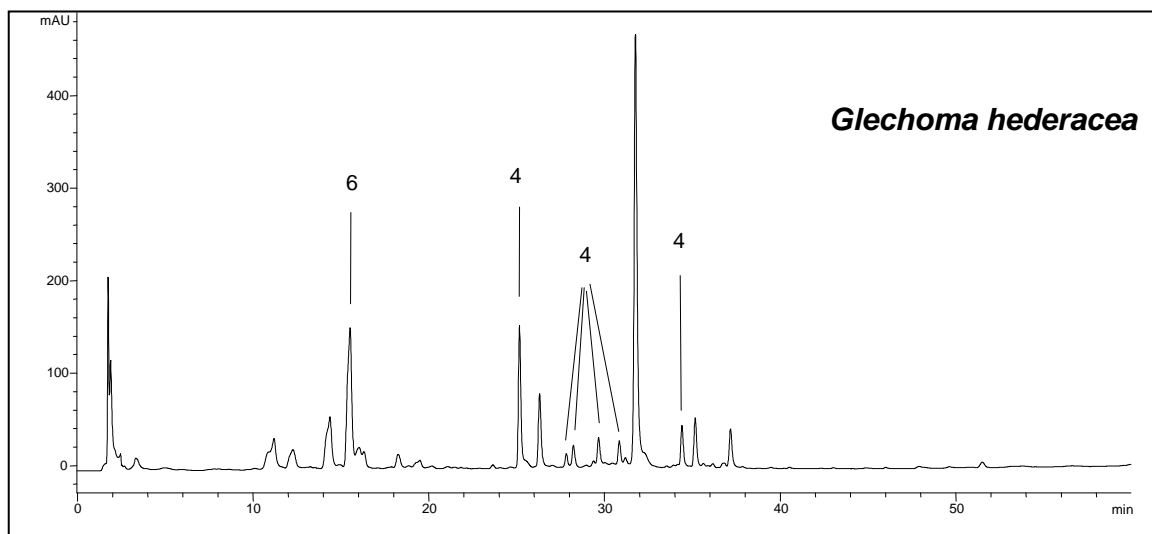
V řepíku lékařském byla zjištěna přítomnost katechinů (pík č.1) a derivátů kvercetinů nebo jiného flavonolu (píky č.4).

Obr. č.17 Záznam analýzy kontryhele obecného

V kontryhelu obecném jsou přítomny tyto fenolické látky: katechin (pík č.1) a deriváty kvercetinu nebo jiného flavonolu (píky č.4).

Obr. č.18 Záznam analýzy meduňky lékařské

V meduňce lékařské byly zjištěny deriváty kvercetinu nebo jiného flavonolu (píky č.4), kyselina chlorogenová (pík č.6), která je přítomna také v bříze bělokoré a popenci břechťanovitém a kyselina kávová (pík č.7), z celého souboru bylin přítomna pouze zde.

Obr. č.19 Záznam analýzy popence břechťanovitého

V popenci břechťanovitém jsou přítomny deriváty kvercetinu nebo jiného flavonolu (píky č.4) a kyselina chlorogenová (pík č.6).

Tab. č.20 Porovnání výskytu fenolických látek v léčivých rostlinách identifikovaných pomocí HPLC

Fenolická sloučenina	Léčivé rostliny							
	bez	bříza	jitrocel	tužebník	řepík	kontryhel	meduňka	popenec
katechin	-	+	-	+	+	+	-	-
k. kumarová	-	-	-	+	-	-	-	-
rutin	+	-	-	+	-	-	-	-
der. kvercetinu	+	+	+	+	+	+	+	+
kvercetin	-	-	-	+	-	-	-	-
k. chlorogenová	+	+	-	-	-	-	+	+
k. kávová	-	-	-	-	-	-	+	-

Volný kvercetin nebyl nalezen v žádné léčivce lyofilizované ani volně sušené, pouze u tužebníku jilmového byl identifikován pík volného kvercetinu v množství blížícím se mezi stanovitelnosti. Je to způsobeno obecně velmi vysokým množstvím celkového kvercetinu v léčivce.

Při porovnání metod stanovení je zřejmé, že kapilární elektroforéza s detekcí UV spektrem a detektorem s fotodiodovým polem je vhodná metoda pro stanovení známých sloučenin v rostlinném materiálu. Metoda HPLC s UV detekcí, která je pro analýzu flavonoidů velmi rozšířená, je používána spíše pro určení neznámých látek a pro bližší kvantitativní a kvalitativní determinaci sloučenin.

2. Závěr

Závěry vyplývající z řešení zadané diplomové práce lze shrnout takto:

Obsah celkového kvercetinu a rutinu byl zkoumán v souboru 8 léčivých rostlin (tužebník, řepík, jitrocel, bříza, bez, meduňka, kontryhel a popenec), které jsou běžně využívané v České Republice.

Nejvyšší obsah celkového kvercetinu v lyofilizovaném materiálu byl nalezen v tužebníku jilmovém (14200 mg/kg sušiny), bříze bělokoré (11800 mg/kg sušiny) a bezu černém (9640 mg/kg sušiny). Volný kvercetin nebyl nalezen v žádné léčivce.

Nejvyšší obsah rutinu v lyofilizovaném materiálu byl naměřen v bezu černém (17700 mg/kg sušiny) a popenci břečťanovitém (5690 mg/kg sušiny). Velmi podobné hodnoty byly naměřeny i ve volně sušeném materiálu. Obsah celkového kvercetinu a rutinu se během sušení nemění. Metoda sušení, která je nejpoužívanější a nejméně náročná je pro rostlinný materiál vhodná a nedochází při ní ke změně obsahu flavonoidů.

Výsledky získané metodou HPLC a metodou CE uvedené v této studii dosahují dobré shody. Stanovené údaje o obsahu celkového kvercetinu uvedené v této práci nebyly dosud v literatuře publikovány.

V. POUŽITÁ LITERATURA

- Andrejev S., Barinov V. (1990): Lékárna na dosah ruky. Lidové nakladatelství Praha. str.192.
- Atkinson M. D., Atkinson E. (2002): *Sambucus nigra* L. J. Ecol., 90, 895 – 923.
- Berhow M. A., Vaughn S. F. (1999): Higher plant flavonoids: Biosynthesis and chemical ecology. Principles and Practises of Plant Ekology. CrC Press. Illinois, USA, str. 423-438.
- Carnat A. P., Carnat A., Fraisse D., Lamaison J. L. (1998): The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. Pharm. Acta Helv., 72, 301 – 305.
- Correia H., Gonzáles-Paramás A., Amaral M. T., Santos-Buelga C., Batista M. T. (2006): Polyphenolic profile characterization of *Agrimonia eupatoria* L. by HPLC with different detection devices. Biomed. Chromatogr., 20, 88 – 94.
- Craig W. J. (1999): Health-promoting properties of common herbs. Am. J. Clin. Nutr., 70, 491 – 499.
- Cook N. C., Samman S. (1996): Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. J. Nutr. Biochem., 7, 66 – 76.
- Dadáková E., Procházková, E., Křížek M. (2001): Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials. Electrophoresis, 22, 1573 – 1578.
- Dawidowicz A.L., Wianowska D., Gawdzik J., Smolarz D.H. (2003): Optimization of ASE Conditions for the HPLC determination of rutin and Isoguercitrin in *Sambucus nigra* L. J.Liq. Chromatogr. Rel. Tech., 26 (14), 2381 - 2397.
- Dolník V. (1994): Úvod do kapilární elektroforézy. Ústav analytické chemie AV ČR, Brno.
- Drbal K., Křížek M. (1999): Analytická chemie, ZF JU České Budějovice.

Harmatha J. (2002): Fenyylpropanoidy, lignany a jejich biologické účinky. In Chemie a biochemie přírodních látek, ÚOCHB, Praha, str. 117 – 143.

Hässig A., Liang W. X., Schwabl H., Stampfli K. (1999): Flavonoids and tannins: plant – based antioxidants with vitamin charakter. Med. Hypotheses, 52 (5), 479 – 481.

Heneberg V.(1992): Pěstujeme léčivé rostliny, Dona České Budějovice, str.103.

Herodež Š. S., Hadolin M., Škerget M., Knez Ž. (2003): Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. Food Chem., 80, 275 – 282.

Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., Vemena D. P. (1992a): Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. J. Agric. Food Chem., 40 (9), 1591 – 1598.

Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., Katan M. B. (1992b): Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. J. Agric. Food Chem., 40, 2379 – 2383.

Hollman P.C.H., Hertog M.G.L., Katan M.B. (1996): Analysis and health effects of flavonoids. Food Chem., 57 (1), 43 – 46.

Hollman P.C.H., Katan M.B. (1998): Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. Arch. Toxicol., suppl. 20, 237 – 248.

Jirásek V., Starý F. (1986): Atlas léčivých rostlin, SPN Praha, str. 368.

Kaack K., Austed T. (1998): Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. Plant Foods Hum. Nutr., 52 (3), 187 – 198.

Keinänen M., Julkunen-Tiitto R. (1998): High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. J. Chromatogr. A, 793, 370 – 377.

Kolesnikov M. P., Gins V. K. (2001): Phenolic substances in medicinal plants. *Appl. Biochem. Mikrobiol.*, 37 (4), 392 – 399.

Korbelář J., Endris Z. (1985): *Naše rostliny v lékařství*. Avicenum, Praha.

Krasnov E. A., Raldugin V. A., Shilova I. V., Avdeeva E. Y. (2006): Phenolic compounds from *Filipendula ulmaria*. *Chem. Natur. Prod.*, 42 (2), 148 – 151.

Lahtinen M., Lempa K., Salminen J. P., Pihlaja K. (2006): HPLC analysis of leaf surface flavonoids for the preliminary classification of birch species. *Phytochem. Anal.*, 17, 197 – 203.

Lachman J., Orsák M., Pivec V. (1999): Flavonoidní antioxidanty a askorbová kyselina cibule (*Allium cepa* L.). *Zahradnictví*, 26, 125 – 134.

Lachman J., Orsák M., Pivec V., Faustusová E. (2000): Content of rutin in selected plant sources. *Sci. Agr. Bohem.*, 31, 89 - 99.

Mayer J. G., Uehleke B., Saum K. (2004): *Bylinky z klášterní lékárny*, Euromedia Group Praha, str. 432.

Middleton E., Kandaswami C. (1993): The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer in the flavonoids: advances in research since 1986, Chapman and Hall London, 619 – 645.

Papp I., Apáti P., Andrasek V., Blázovics A., Balázs A., Kursinszki L., Kite G. C., Houghton P. J., Kéry Á. (2004): LC-MS analysis of antioxidant plant phenoloids. *Chromatografia*, suppl. 60, 93 – 100.

Rhodes M. C. J., Price K. R. (1997): Identification and analysis of plant phenolic antioxidants. *Eur. J. Cancer Prev.*, 6, 518 – 521.

Samuelsen A. B. (2000): The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. *J. Ethnopharmacol.*, 71, 1 – 21.

Slanina J., Táborská E. (2004): Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. Chem. Listy, 98, 239 – 245.

Tomlinson C. T. M., Nahar L., Copland A., Kumarasamy Y., Mir-Babayev N. F., Middleton M., Reid R. G., Sarker S. D. (2003): Flavonol glykosides from the seeds of *Agrimonia eupatoria* (Rosaceae). Biochem. Syst. Ecol., 31, 439 – 441.

Tříška J. (1979): Evropská flóra, Atria Praha, str. 297.

Velíšek J. (1999): Antioxidanty in Chemie potravin 3, OSSIS Tábor, 159 – 174.

Wach A., Pyrzyńska K., Biesaga M.(2007): Quercetin content in some food and herbal samples. Food Chem.,100 (2), 699 - 704.

Žiaková A., Brandšteterová E., Blahová E. (2003): Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. J. Chromatogr. A., 983, 271 – 275

VI. PŘÍLOHY

Příloha č.1 Sběr a úprava léčivých rostlin

Matečná rostlina	Sbíraná část	Doba sběru	Sesýchací poměr	Způsob sušení	Způsob skladování
Bez černý <i>Sambucus nigra</i>	květy	květen až červen	6:1	volně, dosoušení v sušárně tepl.do 30°C, sušení co nejdříve po sběru	papírové nebo jutové pytle
	plody	srpen až září	8:1	v sušárně do 40°	plechové nebo skleněné obaly
Bříza bělokorá <i>Betula pendula</i>	listy	duben až červen	4:1	přirozeným teplem nebo v sušárně tepl. Do 40°C	jutové pytle, pozor, snadno vlhne a plesniví
Jitrocel kopinatý <i>Plantago lanceolata</i>	listy	květen až srpen	5-8:1	rychlé, v tenké vrstvě a při dokonalém větrání, jinak listy černají, nejlépe v sušárně tepl. do 50°C	polyetylenové obaly, náročné skladování, droga snadno vlhne, přesušená se naopak drolí
Kontryhel obecný <i>Alchemilla vulgaris</i>	přízemní listy s řapíkem	květen až srpen	5:1	přirozeným teplem nebo v sušárně tepl do 40°C	papírové pytle
	kvetoucí nať				
Meduňka lékařská <i>Melissa officinalis</i>	bohatě olistěná, kvetoucí nať	postupně dvě sklizně, červen až červenec, srpen až září	4-5:1	přirozeným teplem, ve stínu nebo v sušárně do 40°C	papírové pytle nebo plechovky, ne déle než 1 rok (rychle ztrácí silici)
Řepík lékařský <i>Agrimonia eupatoria</i>	kvetoucí, ale ne překvetlá nať	červenec až září	4-5:1	v zavěšených otýpkách přirozeným teplem nebo v sušárně tepl. do 45°C	papírové nebo jutové pytle, pozor, droga se snadno drolí

(Jirásek a Starý, 1986)

Poznámka: data o tužebníku jilmovém a popenci brečťanovitém nebyly v literatuře uvedeny.