

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Stanovení resveratrolu a dalších antioxidantů v rostlinných
matricích metodami hmotnostní spektrometrie**

Diplomová práce

Bc. Veronika Truncová

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

doc. Ing. Petr Kačer, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení resveratrolu a dalších antioxidantů v rostlinných matricích metodami hmotnostní spektrometrie" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.04.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu doc. Ing. Petrovi Kačerovi za vedení, odborné rady, příjemný přístup a věnovaný čas při zpracovávání této diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala svým přátelům a rodině, kteří mi při tvorbě této práce hodně pomohli a věnovali slova podpory.

Stanovení resveratrolu a dalších antioxidantů v rostlinných matricích metodami hmotnostní spektrometrie

Souhrn

Diplomová práce se v teoretické části věnuje vybraným rostlinným matricím bohatým na polyfenolické látky. Následuje popis a rozdělení polyfenolů. Dále se práce zaměřuje na vybrané polyfenolické látky. Podrobně byl popsán resveratrol a jeho izomery spolu s jeho syntézou. Poté jsou popsány izomery piceidu. V neposlední řadě je charakterizován emodin a jeho glykosidická forma, kde jsou popsány i jejich genotoxické účinky. Následující důležitou částí je vliv antioxidantů, potažmo resveratrolu, na lidské zdraví. Jeho neopomenutelný vliv na kardiovaskulární onemocnění, chemoprotektivní účinky, vliv na Alzheimerovu chorobu či využití schopnosti mimikce restrikce kalorií. Poté práce krátce popisuje Francouzský paradox, který je s červeným vínem, respektive resveratrolem spojován již více než 30 let. V další části jsou uvedeny důležité legislativní vyhlášky týkající se využití resveratrolu pro tvorbu doplňků stravy a léků. Poslední část literární rešerše krátce popisuje využitou chemickou metodu HPLC-MS, jenž byla využita při analýze.

Druhá, praktická, část této práce, je věnována vývoji metodiky stanovení resveratrolu a dalších antioxidantů v rostlinných matricích. Tato metoda kombinuje jednotlivé způsoby extrakce spolu s vysoce účinnou separační technikou v kombinaci s detekční metodou hmotností spektrometrie. Extrakce byla provedena ve čtyřech variantách. První tři varianty měly totožný postup, pouze se liší použitými extraktanty. Jako extraktant byla použita směs methanolu a vody (50:50) nebo směs acetonitrilu a vody (50:50) či také samotný methanol. Nová forma extrakce spočívala ve využití tekutého dusíku a jeho fyzikálně-chemických vlastností. Tyto metodiky byly porovnány pro získání nejefektivnější metody získávání bioaktivních látek. Z výsledků vyplývá, že nejefektivnějším typem extrakce resveratrolu a dalších antioxidantů, je extrakce pomocí tekutého dusíku, což je metoda námi navrhnutá, následně validovaná. Výtěžky v jednotlivých částech rostliny (Křídlatka japonská) byly pomocí této metody až o několik desítek mg/g rostliny vyšší oproti zbylým typům extrakce. Také bylo zjištěno, že nejvíce resveratrolu, piceidu i emodinu se nachází ve stonku rostliny. Druhou částí s vysokou výtěžností byl kořen, přičemž listy rostliny obsahují pouze zanedbatelné množství. Kromě toho bylo zjištěno, že na výši obsahu těchto bioaktivních látek, má vliv měsíc, kdy dochází ke sběru rostlin, mezi nejlepší dobu sběru patří měsíce květen, srpen a září.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, chromatografie, oxidační stres, resveratrol

Determination of resveratrol and other antioxidants in plant matrices by mass spectrometry methods

Summary

The theoretical part of the thesis is devoted to selected plant matrices rich in polyphenolic substances. It is followed by a description and classification of polyphenols. Then the thesis focuses on selected polyphenolic substances. Resveratrol and its isomers were described in detail together with its synthesis. Then the isomers of piceid are described. Finally, emodin and its glycosidic form are characterized, where its their genotoxic effects have also been described. The next important part is the influence of antioxidants, and resveratrol in particular, on human health. Its unforgettable influence on cardiovascular disease, chemoprotective effects, influence on Alzheimer's disease or the use of the ability to mimic calorie restriction. The thesis then briefly describes the French Paradox, which has been associated with red wine, especially resveratrol for more than 30 years. In the next section, important legislative decrees concerning the use of resveratrol for the formulation of dietary supplements and drugs are presented. The last part of the literature search briefly describes the HPLC-MS chemical method used in the analysis.

The second, practical, part of this thesis is devoted to the development of a methodology for the determination of resveratrol and other antioxidants in plant matrices. This method combines individual extraction methods together with a highly efficient separation technique in combination with a mass spectrometry detection method. The extraction was carried out in four variants. The first three variants had an identical procedure, only differing in the extractants used. The extractant used was a mixture of methanol and water (50:50) or a mixture of acetonitrile and water (50:50) or methanol alone. The new form of extraction consisted in the use of liquid nitrogen and its physico-chemical properties. These methodologies were compared to obtain the most efficient method of extracting bioactive compounds. The results show that the most efficient method for extraction of resveratrol and other antioxidants, is extraction using liquid nitrogen, a method proposed and subsequently validated by us. Yields in individual plant parts (Japanese knotweed) using this method were up to several tens of mg/g of plant higher than the other extraction types. It was also found that most resveratrol, piceid and emodin were found in the stem of the plant. The second part with high yield was the root, while the leaves of the plant contained only negligible amounts. In addition, it has been found that the month in which the plants are harvested has an effect on the level of these bioactive compounds, with the months of May, August and September being among the best harvesting times.

Keywords: mass spectrometry, chromatography, oxidative stress, resveratrol

Obsah

1 Úvod.....	10
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	11
3 Literární rešerše.....	12
3.1 Rostlinné matrice.....	12
3.1.1 Křídlatka japonská.....	12
3.1.2 Réva vinná.....	13
3.1.3 Třezalka tečkovaná	14
3.2 Polyfenolické látky.....	15
3.2.1 Resveratrol.....	17
3.2.1.1 Syntéza resveratrolu	20
3.2.2 Piceid.....	21
3.2.3 Emodin	22
3.2.4 Emodin-8-glukosid	24
3.3 Vliv antioxidantů na lidské zdraví	25
3.3.1 Zdroje volných radikálů	26
3.3.2 Účinky resveratrolu na lidské zdraví	27
3.3.2.1 Kardiovaskulární onemocnění	28
3.3.2.2 Onkologická onemocnění	29
3.3.2.3 Alzheimerova choroba.....	30
3.3.3 Francouzský paradox	31
3.3.4 Kalorická restrikce.....	31
3.4 Legislativní požadavky	32
3.4.1 Požadavky na doplňky stravy	32
3.4.2 Požadavky na léčiva	33
3.5 Metoda HPLC-MS.....	33
4 Metodika.....	35
4.1 Stanovení antioxidantů	35
4.1.1 Použité chemikálie.....	35
4.1.2 Použité přístroje k přípravě vzorků.....	35
4.1.3 Příprava vzorků z rostlinných matric	36
4.1.4 Příprava roztoků referenčních látek	36
4.1.5 Stanovení stilbenoidů pomocí HPLC-MS analýzy	37
4.1.5.1 Analytické podmínky HPLC-MS systému	37

4.1.6	Příprava vzorků pro HPLC-MS analýzu.....	38
4.1.6.1	Příprava extrakční metodou.....	38
4.1.6.2	Příprava kryogenní metodou	39
	Validační parametry HPLC-MS	39
5	Výsledky	42
5.1	Stanovení obsahu antioxidantů	42
5.1.1	Porovnání výtěžnosti <i>trans</i> -resveratrolu dle typu extrakce	45
5.1.1.1	Výtěžky <i>trans</i> -resveratrolu v kořenové části.....	46
5.1.1.2	Výtěžky <i>trans</i> -resveratrolu v listové části	47
5.1.1.3	Výtěžky <i>trans</i> -resveratrolu v stonkové části	47
5.1.2	Porovnání výtěžnosti <i>cis</i> -resveratrolu dle typu extrakce	48
5.1.2.1	Výtěžky <i>cis</i> -resveratrolu v kořenové části.....	48
5.1.2.2	Výtěžky <i>cis</i> -resveratrolu v listové části.....	49
5.1.2.3	Výtěžky <i>cis</i> -resveratrolu ve stonkové části	50
5.1.3	Poměr výtěžnosti Resveratrolu ku Emodinu	50
5.2	Výnos resveratrolu a dalších látek v závislosti na čase sběru rostlin.....	51
6	Diskuze	53
7	Závěr	56
8	Literatura.....	57
9	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	63
10	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Resveratrol je polyfenolická látka patřící do skupiny stilbenů, která je známá pro své pozitivní účinky na lidský organismus. Přirozeně se vyskytuje v rostlinách, kde se tvoří jako ochrana před plísněmi či škůdce (Williamson 2017). Resveratrol je sekundární metabolit produkovaný nemnohými rostlinnými druhy („červené“ či „modré“ odrůdy révy vinné, brusnice borůvka, brusnice brusinka, černý rybíz, podzemnice olejná aj.) (Frum 2015). Rostlinné zdroje resveratrolu jsou především Křídlatka japonská a Třezalka tečkovaná (Tian & Liu 2020).

Obecně je známo, že červené víno obsahuje relativně velké množství resveratrolu (až 7 mg/l), a proto byla jeho zvýšená konzumace částečným vysvětlením pro tzv. francouzský paradox. Francouzi totiž trpí relativně nízkým výskytem akutních srdečních příhod, ačkoli je jejich jídelníček poměrně bohatý na nasycené tuky. Vyšší konzumace červeného vína, a právě vysoký obsah resveratrolu, který je tak „podezříván“, že je hlavní příčinou dobrého zdravotního stavu, stejně jako vysoké střední doby dožití Francouzů (Haseeb et al. 2017). Patrně ale nejde jen o jednu chemickou látku, nýbrž o komplex působících látek, a to ještě ve spojení s typickým životním stylem. V současné době stále mnoho vědeckých studií dokládá, že resveratrol (při dávkách v řádech stovek miligramů denně!) je účinnou látkou v prevenci kardiovaskulárních chorob, rakoviny, neurodegenerativních procesů i virových infekcí (Frum 2015). Také jej často užívají aktivní sportovci jako prevenci oxidativního poškození buněčných struktur v důsledku zvýšeného metabolismu indukovaného zvýšenou fyzickou aktivitou.

Resveratrol je považován za tzv. „vychytávač“ (scavenger) volných radikálů, které jsou zodpovědné za nevratné poškození membránových buněčných struktur a také za celkové stárnutí organismu (= oxidační stres) (Embuscado 2015). Přestože je kyslík nepostradatelnou součástí života, tak jeho oxidační vlastnost může poškozovat či částečně znemožňovat některé biologické pochody v lidském těle. Volné radikály v těle vznikají jako přidružené produkty buněčných redoxních reakcí (Andreescu & Hepel 2011).

Z těchto důvodů se resveratrol používá jako doplněk stravy či farmakum, avšak je důležité hlídat jeho kvalitu. Vzhledem k většímu zájmu o tuto bioaktivní látku a jí podobné, je žádoucí nalézt metodu s největší možnou výtěžností. Také nás zajímá vliv látek podobných resveratrolu (piceid, emodin). Tato práce se zabývá problematikou nejvyššího zisku pomocí různých druhů extrakce a také rostlinného původu antioxidantu.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je vyvinout a optimalizovat přípravu vzorků z rostlinných matric a vyvinout metodu kombinující separační a detekční techniku (GC-MS, HPLC-MS) využitelnou ke kvalitativní a kvantitativní analýze resveratrolu a dalších polyfenolických látek (piceid, emodin, emodin-glukosid ad.), které fungují jako vycytávače reaktivních kyslíkových radikálů (ROS, reactive oxygen species) a napomáhají tak posunout antioxidační ochranu organismu. Úkolem bude nejen vyvinout standardizovanou metodiku přípravy vzorku, ale rovněž metodu kombinující chromatografickou techniku s hmotnostně spektrometrickou detekcí a metodu validovat.

Hypotéza: V rostlinných matricích obsahujících resveratrol je řada strukturně podobných látek, které mohou rovněž fungovat jako zhášeče volných radikálů (ROS) (tj. komplex působících látek).

3 Literární rešerše

3.1 Rostlinné matrice

Rostlinná říše je zdánlivě nevyčerpatelným zdrojem látek, které mají pozitivní vliv na lidský organismus. Mezi zkoumané rostlinné matrice, které vykazují vyšší obsah flavonoidů, především námi zkoumaného resveratrolu, piceidu a dalších polyfenolických látek, patří rostliny Réva vinná, Křídlatka japonská a Třezalka tečkovaná (Tian & Liu 2020). V této práci se zaměříme na Křídlatku japonskou, ale přiblížíme si i zbylé rostlinné matrice.

3.1.1 Křídlatka japonská

Léčivá rostlina, která je známá pro své farmakologické účinky a velmi hojně používaná v tradiční čínské medicíně. Latinským názvem – *Reynoutria japonica*, patří k nejznámějšímu druhu z rodu křídlatek (*Reynoutria*) (Peng et al. 2013). Spadá do čeledi rdesnovité (*Polygonaceae*) (Cucu et al. 2021). Kořen této rostliny se používá k léčbě zánětů, infekcí a hyperlipidémie (porucha lipidového metabolismu). Nové výzkumy však ukazují, že pozitivních účinků je mnohem více, například protišokový, protizánětlivý, antioxidační, protinádorový, antivirový účinek a další.

Křídlatka je bohatým zdrojem sloučenin s léčivým efektem. Rozsáhlé výzkumy, které se zabývají fytochemií rostliny, objevily více než 67 léčivých látek, například chinony, stilbeny, flavonoidy, kontramaryny, ligany a další fytochemické sloučeniny.

Jedná se o vytrvalou bylinu, která se dorůstá až do výšky 2 metrů, lodyhy rostou vzpřímeným růstem a uvnitř jsou duté. Rostlina je často poseta červenými či fialovými skvrnami a opadavými lehce špičatými listy. Květenství jsou osinatá, latnatá a přibližně 3-8 cm dlouhá. Každé květenství obsahuje dva až čtyři květy, které jsou bílé až lehce nazelenalé, složené z pěti okvětních lístků. Samčí květy mají osm tyčinek, zatímco samičí mají tyčinky tři. Plody této rostliny jsou černohnědé, lesklé, vejčité elipsoidní a 4-5 cm velké (Peng et al. 2013).

Rostlina původem z Asie (Čína, Japonsko, Tchaj-wan, Severní a Jižní Korea) a Severní Ameriky. Roste na slunných místech poblíž břehů řek nebo na pastvinách díky přítomnosti dusíku ze zemědělských hnojiv. Do Evropy byla zavlečena během 19. století kvůli okrasným účelům (Cucu et al. 2021). V Evropě agresivně napadá antropogenní a polopřirozená přírodní stanoviště, kde vytváří husté, téměř monokulturní, porosty. Patří k tzv. transformátorům porostu, kdy mění charakter, stav, formu či povahu ekosystémů na značné ploše (Stefanowicz et al. 2017). Přestože může mít Křídlatka japonská signifikantní negativní dopad na okolní prostředí, tak výzkumy ukazují, že může mít mnohá pozitivní využití. Například může mít pozitivní vliv z hlediska využití jako potraviny či krmiva, léků, paliva, bioenergie, insekticidního a fungicidního přípravku či organického hnojiva (Cucu et al. 2021). Na obrázku níže (Obrázek č. 1) můžeme vidět rozkvetlou Křídlatku japonskou.



Obrázek č. 1: Křídlatka japonská (iNaturalist 2011)

3.1.2 Réva vinná

Jedná se o nejrozšířenější a nejvíce pěstovanou rostlinu čeledi *Vitaceae L.*, jenž se pěstuje nejen na výrobu vína a hroznové šťávy, ale i pro konzumaci ve formě rozinek či čerstvých hroznů (Encyclopaedia Britannica 2023). Vzhledem ke své odolnosti a přizpůsobivosti podmínkám, bývá její produkce vysoká. Zhruba polovina se využívá na výrobu vína a fermentovaných výrobků, třetina je využita ke konzumaci v čerstvém stavu a v řádu jednotek ji využíváme k výrobě rozinek a hroznové šťávy (Creasy & Creasy 2018).

Réva vinná – *Vitis vinifera* je dřevnatá liána, která se uchycuje pomocí úponků. V případě, že nezkracujeme úponky, může se rozrůst až do délky 17 metrů. K nárustu do těchto délek však dochází pouze za podmínky vhodného podnebí a podhůří. Díky svým dlouhým a velmi rozvětveným kořenům však přežívá i v méně hostinných podmínkách. Nadzemní část rostliny tvoří jedlé listy a bobule, doplněné o květy, které bývají světle žluté s nádechem do zelena (Encyclopaedia Britannica 2023).

Plody této rostliny nazýváme bobule, jenž mají vejčitý či kulovitý tvar a vyrůstají z oplodněného květu. Plod sestává ze 3 částí, jimiž jsou semena, dužina a slupka. Přítomnost a počet semen je dán kultivarem rostliny. Jejich přítomnost v plodu je důležitá pro vývoj a velikost výsledného plodu, avšak jejich absenci využíváme v bezsemenných plodech určených ke konzumaci v čerstvém stavu (Creasy & Creasy 2018). Na obrázku níže (Obrázek č. 2) můžeme vidět rostlinu Révy vinné, konkrétně modrou odrůdu.



Obrázek č. 2: Rostlina Révy vinné, (Encyclopaedia Britannica)

Réva vinná se rozšířila z území původního Jižního Kavkazu, dnešního Turecka, přes Ázerbájdžán, do Palestiny, Sýrie či Egypta, kdy se přes Středozevní moře dostala až do Evropy. V Evropě došlo k značnému rozvoji pěstování révy vinné a díky tomu je označována jako evropská.

Vysoká popularita této rostliny zapříčinila vznik mnoha odrůd, kdy se jejich počet odhaduje na 24 000, avšak mnohdy se jedná o totožný kultivar, a proto se výsledný odhad pohybuje kolem 4 000 odrůd. Typickým příkladem je Shiraz neboli také Syrah. Konečnou produkci však z 50 % tvoří vína 33 odrůd a následujících 33 % tvoří dalších 13 kultivarů, zbylých 17 % produkce je tvořena odrůdami vysazovanými v menším počtu, či kultivary, které jsou vysazovány pro zachování genofondu. K nejpěstovanějším odrůdám patří především Chardonnay, Merlot či Cabernet Sauvignon (Creasy & Creasy 2018).

3.1.3 Třezalka tečkovaná

Jedná se o vytrvalou bylinu, která se řadí do čeledi Třezalkovité (*Hypericaceae*) s latinským názvem *Hypericum perforatum*. Roste především v mírných a tropických oblastech. V České republice roste především na stanovištích s vyšším podílem slunečního svitu v nízkých až středních nadmořských výškách (Menichini et al. 2013).

Rostlina má jednoduché protistojné nebo vrcholičnaté květy, které jsou žláznatě tečkované s lehkým lemováním okrajů. Květy jsou pětičetné a výrazně žluté, s typickým velkým množstvím tyčinek, které mohou tvořit i svazečky. Plodem této rostliny jsou suché

tobolky. Třezalka se rozmnožuje nepohlavně pomocí plazivých oddenků. Fotografie rostliny níže (Obrázek č. 3), názorně ukazuje rozkvetlou Třezalku tečkovanou.



Obrázek č. 3: Třezalka tečkovaná, (INaturalist, 2011)

Užívání této rostliny jako farmaka pro vnitřní i vnější problémy se datuje už od dob Starověkého Řecka. Od té doby je využívána pro různá odvětví od léčby úzkostí, depresí, řezných ran či popálenin (Benzie & Wachtel-Galor 2011). V bylinkářství se používá jako lék na deprese, avšak tento vliv je podložen pouze omezeným množstvím klinických studií (Encyclopaedia Britannica 2023). Povědomí o této rostlině se zvyšuje, protože se stále rozrůstá seznam biologicky aktivních látek, které obsahuje, jež mají kladný vliv na zdraví člověka (Krasowski & Blau 2010). Biologicky aktivní látky, pro které je rostlina především známá jsou hypericin a hyperforin. Tyto látky vykazují nadměrnou léčivou aktivitu. Dalšími látkami jsou flavonoidy jako rutin a kvercetin, v neposlední řadě samozřejmě resveratrol (Benzie & Wachtel-Galor 2011).

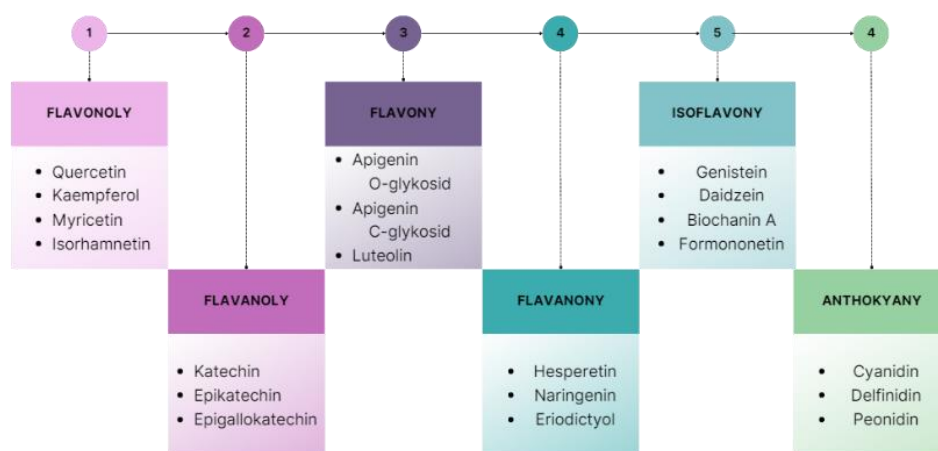
3.2 Polyfenolické látky

Polyfenolické látky, které se také označují jako polyfenoly, což není striktní chemický název, mají mnohá označení. Používá se také pojmenování flavonoidy, třísloviny či fenolové kyseliny.

Po chemické stránce jsou polyfenoly tvořeny aromatickými kruhy a heterocyklickými útvary. Díky rozložení jednotlivých aromatických kruhů mají jednotlivé sloučeniny své specifické vlastnosti (Boots et al. 2008).

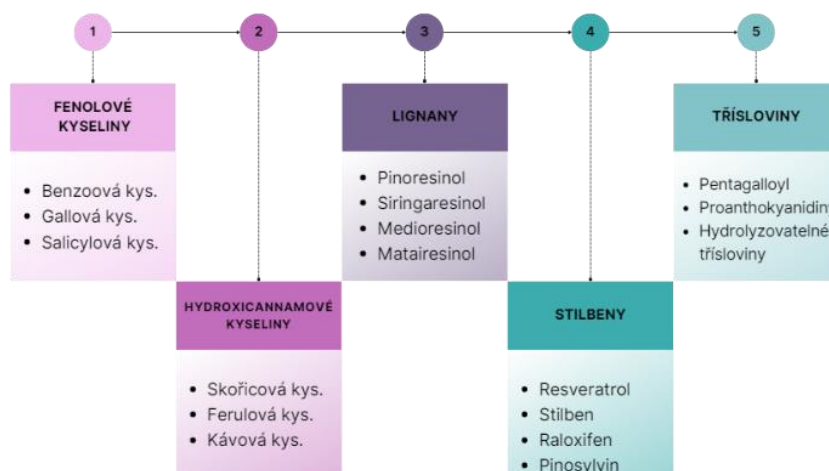
Tyto fytochemikálie se dělí na flavonoidy a neflavonoidní molekuly. Mezi flavonoidy se řadí flavonoly, flavanoly, flavony, flavanony, isoflavony a antokyany. Do druhé skupiny neflavonoidních molekul patří fenolové kyseliny, hydroxycinnamové kyseliny, lignany, stilbeny a třísloviny (Di Lorenzo et al. 2021). Neflavonoidy jsou známé především pro své silné antioxidační účinky. Flavonoidy, které jsou rozděleny do podtříd na základě strukturálních charakteristik, jsou také spojovány s mnohými léčivými benefity. Mezi nejrozšířenější zdraví prospěšné látky patří *trans*-resveratrol, kvercetin, galová kyselina či katechin (Giovinazzo et al. 2018). Na následujících obrázcích (Obrázek č. 4 a 5) vidíme rozdělení polyfenolů flavonoidních a neflavonoidních spolu s některými zástupci.

Polyfenoly - flavonoidy



Obrázek č. 4: Rozdělení flavonoidních polyfenolů (Upraveno, (Giovinazzo et al. 2018; Boots et al. 2008))

Polyfenoly - neflavonoidy



Obrázek č. 5: Rozdělení neflavonoidních polyfenolů (Upraveno, (Giovinazzo et al. 2018; Boots et al. 2008))

Polyfenoly se nacházejí v potravinách a nápojích rostlinného původu, především v ovoci (bobulovinách a citrusových plodech), také v kávě, čaji či kakau. Přispívají k celkové sensorice potravy, především ovlivňují chuť a barvu plodin. Mezi polyfenolické látky, které se vyskytují ve stravě patří flavanoly, jež můžeme například najít v kakau, čaji či jablcích. Flavanony najdeme především v citrusových plodech, hydroxycinnamáty jsou obsaženy v kávě a mnoha druzích ovoce. Další skupinou jsou antokyany, které nalezneme především v bobulovinách. Poslední skupinou jsou flavonoly, kam patří látky jako kvercetin a resveratrol, ty se nachází především v čaji, jablkách a v révě vinné (Williamson 2017). Významným zdrojem polyfenolických látek jsou různé druhy sušeného ovoce. Nejvyšší obsah byl naměřen v rozinkách a švestkách, následovaly například meruňky, fíky, datle a hrušky (Chang et al. 2016).

Biologické účinky polyfenolů byly zkoumány především pro své ochranné funkce v rostlinách, například ochrana před stresem, který může být způsoben UV zářením či škůdci (Williamson 2017). Za tyto účinky mohou převážně flavonoidy, které jsou přítomné ve fotosyntetizujících buňkách. V přírodě nalezneme více než 5000 druhů polyfenolů a jejich počet s každým rokem narůstá. Pro své blahodárné účinky na lidský organismus jsou hojně používány v lécích, doplňcích stravy a je jimi obohacována běžná strava (Boots et al. 2008).

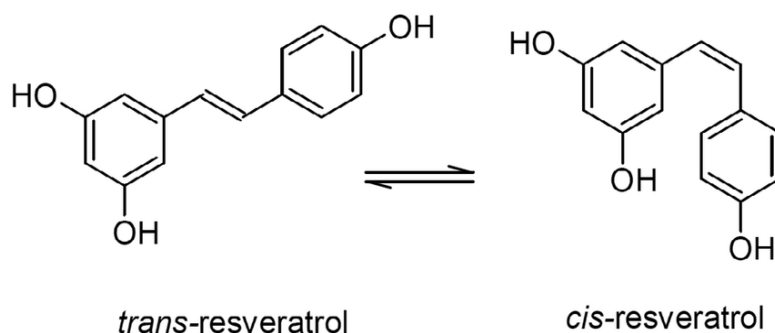
Polyfenolické látky působí jako antioxidanty, což znamená, že mohou odstraňovat volné radikály, nebo inhibovat oxidaci lipidových látek a sloučenin. V neposlední řadě snižují tvorbu hydroperoxidů (Xia et al. 2010). Prospěšný vliv těchto látek může narušit reakce –OH skupiny s jinými sloučeninami, například sulfáty, methyly, cukry či jinými podobnými sloučeninami. Výsledný efekt polyfenolů je dán také celkovým vstřebáním spolu se střevní mikrobiotou, která má schopnost ovlivnit výši resorpce a koncentrace v gastrointestinálním traktu (Caballero et al. 2016).

3.2.1 Resveratrol

Tento polyfenol patří k široce prozkoumaným antioxidantům pro svůj benefitní vliv na lidské tělo, ke kterým se řadí i účinky proti stárnutí. Poprvé byl detekován ve 40. letech 20. století z Kýchavice velkokvěté (*Veratrum grandiflorum*) (Aggarwal et al. 2004).

Z chemického hlediska se tato látka řadí k polyfenolům, do podtřídy stilbenů s molekulární hmotností 228,24 g/mol a chemickým vzorcem 3,4,5 – trihydroxystilben ($C_{14}H_{12}O_3$) (Pubchem 2022b). Resveratrol je citlivý na světlo, pH a zvýšenou teplotu kvůli nestabilním hydroxylům a dvojně vazbě C-C. Tato skupina, jak již z názvu vyplývá, obsahuje více – OH skupin, díky kterým mají notný antioxidační význam. Resveratrol se vyskytuje ve dvou izomerických formacích, a to v *trans*- a *cis*- formě (Kuršvietienė et al. 2016).

Na následujícím obrázku (Obrázek č. 6) můžeme vidět vzorec *trans*-resveratrolu a *cis*-resveratrolu.



Obrázek č. 6: Strukturální vzorec *trans*-resveratrolu a *cis*-resveratrolu, (Naiker et al. 2020)

Dosud byl resveratrol nalezen v mnoha rostlinách a také ve značném počtu potravin, mezi něž patří například hrozny, arašidy, borůvky či brusinky. Významným zdrojem resveratrolu je réva vinná, kde se nachází až ve dvojnásobném množství oproti výše zmíněným potravinám (Aggarwal et al. 2004). V následující tabulce můžeme vidět část přehledu vybraných rostlin a jejich naměřený obsah resveratrolu.

Tabulka č. 1: Přehled rostlinných zdrojů resveratrolu, (Upraveno, (Tian & Liu 2020))

Čeleď	Rod	Druh	Koncentrace (g/kg ⁻¹)
Révovité	Réva	Réva vinná	Plod $3,66 \times 10^{-2}$
Rdesnovité	Křídlatka	Křídlatka japonská	Kořen $4,209 \times 10^{-1}$ Stonek $1,12 \times 10^{-1}$
Liliovité	Kýchavice	Kýchavice černá	Nadzemní část $1,0 \times 10^{-3}$

Další tabulka nám ukazuje naměřené množství v běžných potravinách a nápojích. Zde si můžeme všimnout, že červené víno obsahuje několikanásobně větší množství resveratrolu oproti vínu bílému. Z potravin je pak nejvyšší detekovaný obsah u brusinky a rybízu, přičemž rybíz obsahuje přibližně polovinu ve srovnání s brusinkou.

Tabulka č. 2: Přehled potravinových a nápojových zdrojů resveratrolu, (Upraveno, (Polyphenol 2005))

Druh potravin	Typ	Průměrný obsah (mg/ 100 ml)	Minimální obsah (mg/ 100 ml)	Maximální obsah (mg/ 100 ml)
Tiché víno	Červené víno	0,27	0,00	2,78
	Bílé víno	0,04	0,00	0,17
Čokoláda	Hořká čokoláda	0,04	0,04	0,04
Ovoce	Brusinka	3,00	3,00	3,00
	Rybíz červený	1,57	1,57	1,57
Ořechy	Arašíd	0,08	0,009	1,12
	Pistácie loupané	0,11	0,009	0,16

Přestože je resveratrol přirozenou součástí rostlin, tak je biosyntetizován rostlinou většinou v případě napadení plísněmi, v reakci na stres, při působení UV záření či vnějšího poškození. Konkrétně biosyntéza stilbenu – resveratrolu vyžaduje přítomnost stilben syntázy spolu s přítomností prekurzorů. Nejčastějšími prekurzorovými látkami jsou malonyl-CoA spolu s p-kumaroyl-CoA (Williamson 2017). Tato funkce je označována jako tzv. antioxidační bariéra, která má za úkol chránit rostlinu před oxidačním stresem a omezit tvorbu ROS (Bononi et al. 2022).

Metabolizace resveratrolu je ovlivněna nejen gastrointestinálním traktem, ale také svou nízkou rozpustností ve vodě (<0,05 mg/ml), čímž je vstřebávání urychleno a je absorbováno až 70 % látky. Přeměna probíhá v játrech, poté se dostane do plazmy a navázáním se na lipoproteiny anebo albumin dojde k urychlenému vstupu sloučeniny do buněk. Dochází také ke vzniku metabolitů, zejména kvůli nízké bioaktivitě původní formy. Metabolity jsou až dvacetkrát koncentrovanější, než je primární forma. Nejvíce vznikají metabolity resveratrol-3-O-sulfátu, resveratrol-3-O-glukuronidu či resveratrol-4-O-glukuronidu, přičemž existuje řada dalších metabolitů (Kuršvietienė et al. 2016).

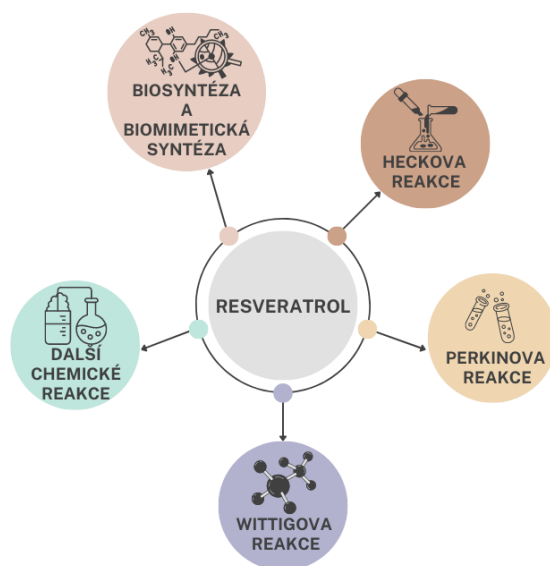
Resveratrol se řadí k pleiotropním látkám díky velkému rozsahu molekulárních cílů, mezi které patří cyklooxygenázy, lipooxygenázy, DNA a další. Je zkoumán zejména pro jeho pozitivní vliv na lidský organismus v různých částech těla. Mezi tyto vlastnosti se řadí ochrana kardiovaskulárního systému, snížení glukózy v krvi (důležité pro onemocnění diabetes mellitus), antioxidační, antikarcinogenní a antiinflamatorické vlastnosti, inhibice agregace krevních destiček při zvýšené produkci oxidu dusnatého. Velkým přínosem může být i při léčbě osteoporózy u žen po menopauze, kdy znemožňuje vznik poškození DNA a peroxidaci lipidů v buněčných membránách. Tento projev je dán terminačním účinkem na radikály

hydroxyly (OH) anebo superoxidu (O_2^-). Dojde zároveň ke zvýšení koncentrací antioxidačních enzymů glutathionu peroxidázy či glutathion reduktázy a dalších glutathion-enzymů (Kuršvietienė et al. 2016). Velikost a hloubka účinku je přímo závislá na redoxním stavu a koncentraci resveratrolu, kdy může působit jako antioxidant či prooxidant (Giovinazzo et al. 2018).

Pro své prospěšné účinky je resveratrol hojně využíván ve formě doplňků stravy. V prodeji se nachází velké množství přípravku s různou kvalitou a biologickou aktivitou. Nejběžněji užívaným přípravkem je lék Evelor, kde je resveratrol ve formě izomeru *trans*- s dávkou 50 mg na jednu kapsli. Účinná látka je získávána z rostliny Křídlatky japonské z kořenové části. Dalším přípravkem na našem trhu je například Resveratrol Glycon HP z Interpharma Praha, a.s., který obsahuje 98 % *trans*-resveratrol glukosidu z kořene Křídlatky japonské (Interpharma-Praha 2019).

3.2.1.1 Syntéza resveratrolu

Resveratrol byl nalezen v 34 čeledích a přes 100 různých druhích rostlin. Získáváme jej z kořenů, stonků a listů, květů, plodů či semen. Z rostliny je extrahován pomocí chemické či biochemické syntézy. Na následujícím obrázku (Obrázek č. 7) můžete vidět používané metody.



Obrázek č. 7: Způsoby chemické a biochemické syntézy resveratrolu (Upraveno, (Tian & Liu 2020))

Prvním způsobem syntézy resveratrolu je Heckova reakce, která je definována jako C-C spojovací reakce arylhalogenidu nebo vinylhalogenidu s aktivovaným olefinem za podmínek katalýzy palladia v přítomnosti fáze. Heckova reakce je důležitá pro syntézu resveratrolu a jeho analogů. Resveratrol, jakožto fytoalexin, lze získat dekarboxylační

reakcí, při níž dojde ke spojení kyseliny 3,5-dihydroxybenzoové s 4-acetoxystyrenem za přítomnosti octanu palladnatého a N, N-bis.(2,6-diisopropylfenyl) dihydroimidazoliumchloridu za vzniku derivátů resveratrolu. Phytoalexin, je nízkomolekulární antimikrobiální látka vznikající v rostlinách při jejím napadení organismy.

Na základě výtěžnosti, která se pohybuje kolem 60-70 %, bylo vyvinuto mnoho katalyzátorů. Vzhledem k jejich vlastnostem a problematice recyklovatelnosti či znečišťování prostředí je na následném zvážení využití této metody.

Druhým způsobem je tzv. Perkinova reakce. Jedná se o organickou reakci, kde dochází k přeměně aromatických aldehydů a anhydridů na alfa- a beta- nenasycené aromatické sloučeniny působením karboxylové kyseliny a octanu sodného. Tato reakce zahrnuje ochranu, kondenzaci, dekarboxylaci a hydrataci, kdy konečný produkt je regioselektivní.

Wittigova reakce patří k dalším způsobům syntézy resveratrolu. Tato reakce využívá přeskupení primárních či sekundárních látek halogenalkanu a aldehydu či ketonu za vzniku olefinového produktu. Působením trifenylofosfinu a báze dojde k uvolnění vedlejšího produktu trifenylofosfinooxidu. Tyto reakce byly běžně využívány k vytvoření dvojné vazby C=C. Tuto metodu využili například Jeandet et al. (1991), kteří syntetizovali *trans*-resveratrol pomocí Wittigovy reakce a studovali produkci resveratrolu z bobulí révy vinné v různých vývojových stádiích. Z jejich výzkumu vyplývá, že resveratrol byl syntetizován v buňkách slupky, avšak v dužině nebyl nalezen či byly naměřeny velmi nízké hodnoty. Přestože se reakce běžně používá k instalaci ethylenového můstku, tak výtěžnost *trans*- produktu, selektivity či obojího naráz je velmi nízká. Průběh reakce vyžaduje zařazení chromatografického čištění, tudíž účinného katalyzátoru.

Kromě standardních reakcí lze resveratrol získat pomocí indukce listů Révy vinné chloridem hlinitým. Při této extrakci dochází k tzv. phytoalexinové reakci, která je vyvolána kovovou solí. Tato metoda nalézá využití taktéž u kontroly vinic na výskyt šedé plísně (*Botrytis cinerea*). Také víme, že retrosyntézu lze použít k analýze struktury resveratrolu a jeho derivátů a následně k syntéze různých polyfenolických látek (Tian & Liu 2020).

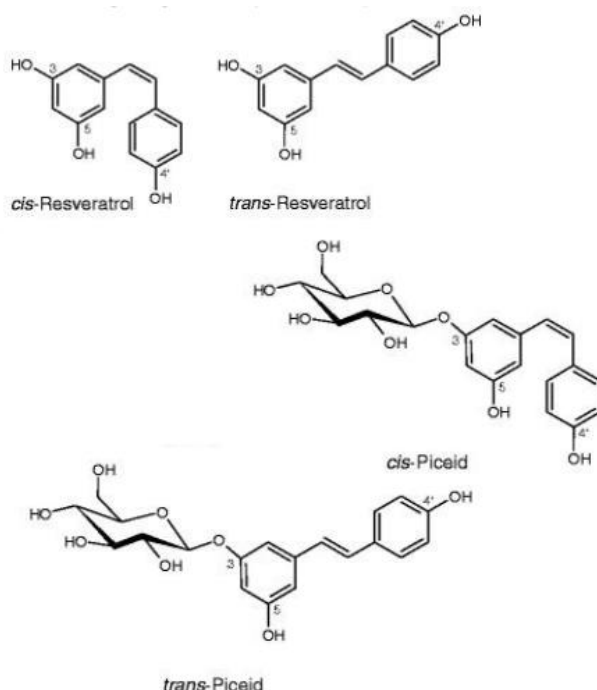
3.2.2 Piceid

Piceid je přírodní prekurzor a glykosidová forma resveratrolu s monokrystalickou strukturou. Izoluje se především ze stromu Smrk sitka (*Picea sitchensis*) a je hlavním derivátem resveratrolu v hroznových šťávách. Hojně je izolován také z Křídlatky japonské.

Biosyntézou piceidu v Křídlatce japonské pomocí plísně Kropidláku rýžového (*Aspergillus oryzae*) vzniká resveratrol, který může být využíván v lékařství, potravinářství a kosmetice (Wang et al. 2007a). Piceid patří mezi nejhojněji zastoupenou formu resveratrolu v přírodě (Su et al 2013).

Vyskytuje se v *trans*- i *cis*- izomerní formě, což může mít za následek rozdílné biologické účinky. *Trans*- izomer je stabilnější a díky tomu je jeho použití častější, naopak *cis*- izomer je komerčně nedostupný, ale lze jej získat z *trans*- izomeru pomocí působení UV záření

(Huang & Mazza 2011). Piceid glukosid v *trans*- formě je tvořen *trans*-resveratrolem a *cis*- forma piceidu se sestává z *cis*-resveratrolu (Leischner et al. 2015). Řada studií naznačuje, že piceid, díky své konformační podobnosti, by mohl mít podobné bioaktivní účinky. K těmto vlastnostem se řadí antikarcinogenní účinky, inhibice shlukování krevních destiček či antioxidační aktivita (Su et al. 2013). Přestože účinky piceidu by měly být srovnatelné s resveratrolem, tak výhodou piceidu je jeho větší stabilita proti světlu a teplu (Gavezzotti et al. 2015). Na následujícím obrázku (Obrázek č. 8) můžeme vidět izomerické formy piceidu a jeho porovnání k resveratrolu.



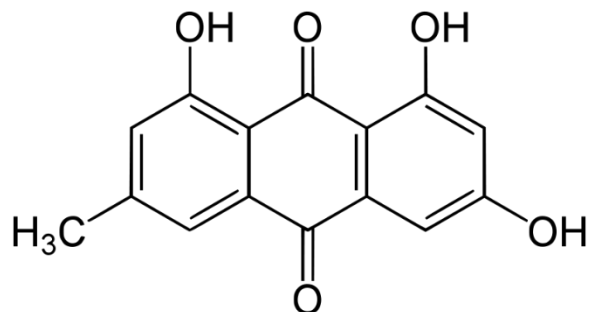
Obrázek č. 8: Izomery piceidu a resveratrolu, (Upraveno (Leischner et al. 2015))

3.2.3 Emodin

Přírodní derivát antrachinonu, který je hojně používán v čínské medicíně, kde je získáván především z Reveně dlanité (*Rheum palmatum*), Křídlatky japonské (*Reynoutria japonica*) a Rdesna mnohokvětého (*Reynoutria multiflora*).

Emodin je pro své léčivé účinky používán déle než 2000 let a dodnes se vyskytuje v mnohých léčivých přípravcích. Mezi jeho četné farmakologické účinky patří protinádorové, hepatoprotektivní, protizánětlivé, antioxidační a antimikrobiální vlastnosti. V nesprávné dávce však může emodin vykazovat známky hepatotoxicity, toxicity pro ledviny či reprodukční toxicitu. Tyto negativní dopady se objeví při dlouhodobém užívání většího množství emodinu ve stravě či pomocí doplňků stravy.

Jak již víme, emodin je přirozeně se vyskytující derivát antrachinonu se systematickým názvem 1,3,8-trihydroxy-6-methylantrachinon, který je obsažen v mnoha bylinách. Tyto byliny jsou využívány a známy především v Asii, kde tvoří velkou část léčiv právě léčiva přírodního původu. Níže na obrázku (Obrázek č. 9) můžeme vidět strukturní vzorec emodinu.



Obrázek č. 9: Chemický vzorec emodinu, (Dong et al. 2016)

Pro své léčivé vlastnosti se v posledních letech hojně zkoumal a bylo zjištěno široké spektrum farmakologických účinků. Jimiž jsou například antivirové, antibakteriální, antialergické, antiosteoporotické, antidiabetické, imunosupresivní, neuroprotektivní a hepatoprotektivní účinky. Emodin byl také studován jako potencionální léčivo ke zmírnění dopadů cukrovky II. typu. Rovněž byla mnohdy využita laxativní vlastnost emodinu jako hlavní mechanismus na podporu hubnutí. Z těchto farmakologických vlastností lze usoudit, že by se mohl emodin využít pro profylaxi a léčbu různých onemocnění, od zácpy, astmatu či atopického ekzému po protektivní účinky při rakovinových onemocněních, dermatitidě, diabetu mellitu, Alzheimerově chorobě a mnoha dalších (Dong et al. 2016).

Nové studie *in vivo* a *in vitro* poukazují na negativní dopady užívání emodinu. Wang et al. (2007b) zkoumali toxicitu rebarbory na laboratorních potkanech a zjistili, že emodin byl promarním toxikantem, kdy největší dopad měl na játra a ledviny. Studie, které následovaly potvrdily, že emodin má negativní dopad na organismus. Tato látka má potenciál narušit glutathion a metabolismus mastných kyselin u člověka. Dále byl objeven cytotoxický účinek v jaterních buňkách Amura bílého (*Grass carp*) prostřednictvím apoptózy přímým ovlivněním mitochondrií. Z toho vyplývá, že užívání vysokého množství emodinu není vhodné pro ryby. Rovněž bylo zjištěno, že reprodukční toxicita emodinu u mužů je dána narušením exprese testikulárních genů (Oshida et al. 2011). Tomuto problému se věnoval také tým vědců Luo et al. (2015), který prokázal, že emodin inhibuje funkce lidských spermií tím, že postupně snižuje jejich počet a potlačuje tyrozinové fosforylace *in vitro*. Další studie ukazuje, že ethanolové extrakty ze šťovíku zahradního (*Rumex patientia*) bohaté na antrachinony, jako jsou emodin a chrysophanol, způsobily nevratné patologické změny při velmi vysokých dávkách (4000 mg/kg váhy). Nižší dávky a vodné extrakty nevyvolaly žádné či zanedbatelné účinky, které byly reverzibilní. Z tohoto důvodu se doporučuje antrachinonům ve vyšších dávkách vyvarovat při těhotenství (Islam et al. 2015). Následující tabulka nám ukazuje část prospěšné aktivity emodinu.

Tabulka č. 3: Farmakologické účinky emodinu, (Upraveno, (Dong et al. 2016))

Farmakologický účinek	Buněčné linie/modely	Druh studie	Mechanismus účinku
Protinádorová aktivita	Buňka rakoviny močového měchýře	<i>In vitro</i>	Moduluje epigenetické modifikace
Protinádorová aktivita	Adenokarcinom plic	<i>In vitro</i>	Modifikuje vnější apoptózu
Protizánětlivá aktivita	Nealkoholická steatohepatitida	<i>In vitro</i>	Potlačuje signalizaci ERK ½ a p38
Antidiabetická aktivita	Pupeční žíla endotelové buňky	<i>In vitro</i>	Potlačuje aktivaci p38 MAPK a EK 1/2

Další tabulka nám ukazuje toxický dopad emodinu u člověka. Veškeré studie probíhaly *in vitro*, čili ve zkumavce.

Tabulka č. 4: Toxicita emodinu v tkáních člověka v *in vitro* studiích, (Upraveno, (Dong et al. 2016))

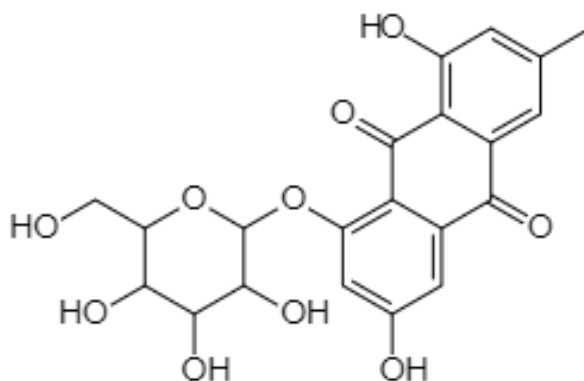
Buněčné linie/modely	Aplikace	Mechanismy účinku
Lidské proximální tubulární epitelové buňky (HK-2)	<i>In vitro</i>	Indukuje apoptózu cestou závislou na kaspáze 3 a na mitochondriální cestě.
Intersticiální Cajalovy buňky	<i>In vitro</i>	Inhibuje aktivitu Na ⁺ -K ⁺ adenosin trifosfatázy a Ca ²⁺ ATPázy
Mužské reprodukční orgány/tkáně	<i>In vitro</i>	Narušuje expresi testikulárních genů
Lidské sperma	<i>In vitro</i>	Snižuje Ca ²⁺ spermií; potlačuje fosforylaci tyrozinu

Genotoxicita emodinu a zákaz přidávání do potravin

Existují *in vivo* studie, které popisují genotoxicitu emodinu, na základě, kterých se EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin) rozhodla přidat emodin na seznam zakázaných záměrných přísad v potravinách. Na tento seznam patří potraviny z nařízení o vitamínech, minerálech a dalších aditivech (Younes at al. 2018). Od roku 2021 je emodin na seznamu zakázaných látek, s tím, že EFSA zatím nepřišla s doporučeným denním množstvím, které by nemělo negativní dopad na lidský organismus (Aquilina et al. 2022).

3.2.4 Emodin-8-glukosid

Tato látka se přirozeně vyskytuje v Reveni dlanité (*Rheum palmatum*), Šťovíku zahradním (*Rumex patientia*) či Křídlatce japonské (*Reynoutria japonica*). Látka řadící se k polyfenolům, konkrétně dihydroxyantrachinonům. Používá se k léčbě akutní hepatitidy díky svým antioxidačním vlastnostem. Předchozí výzkumy ukazují, že reaktivní formy kyslíku interagují s jinými signálními cestami a regulují apoptózu a proliferaci hepatocytů, čímž mohou zmírnit příznaky hepatitidy (Wang et al. 2007b). Na následujícím obrázku můžeme vidět strukturní model emodin-8-glukosidu, se systematickým názvem 1,6-dihydroxy-3-methyl-8-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyanthracene-9,10-dione. (PubChem 2022a).



Obrázek č. 10: Strukturální vzorec emodin-8-glukosidu (PubChem 2022a).

Tato látka, spolu s emodinem, se běžně vyskytuje v rostlinách. Následující seznam ukazuje nejčastější výskyt těchto sloučenin a místo jejich největší koncentrace.

Výskyt sloučenin emodinu a emodin-8-glukosidu v rostlinách (EFSA 2009):

- *Cassia obtusifolia*; semena
- *Cassia occidentalis*; semena
- Vachta trojlistá (*Menyanthes trifoliata*); listy
- *Picramnia antidesma*; nespecifikováno
- Rdesno mnohokvěté (*Polygonum multiflorum*); kořeny
- Řešetlák počistivý (*Rhamnus cathartica*); celá rostlina včetně plodů
- Krušina olšová (*Rhamnus cathartica*); kůra
- Řešetlák Purshův (*Rhamnus cathartica*); celá rostlina
- Reveň lékařská (*Rheum officinale*); radix a oddenek
- Reveň dlanitá (*Rheum palmatum*); radix a oddenek

Genotoxicita emodin-8-glukosidu a zákaz přidávání do potravin

Pomocí in vivo studií byla popsána genotoxicita emodinových derivátů. Úřad EFSA popsal, že aloe-emodin a další deriváty emodinu (emodin, danthron) mohou představovat významný rizikový faktor kolorektálního karcinomu svým genotoxickým účinkem. Proto v březnu roku 2021 byl emodin a jeho deriváty přidán na seznam zakázaných záměrných přísad v potravinách, konkrétně v nařízení o adici vitamínů, minerálů a dalších aditiv (Younes et al. 2018). EFSA nebyla schopna poskytnout jakékoli doporučení týkajícího se denního příjmu hydroxyantracenových derivátů, který by nevyvolával obavy o lidské zdraví (Aquilina et al. 2022).

3.3 Vliv antioxidantů na lidské zdraví

Díky pokroku a větší intenzitě nových výzkumů zjišťujeme, že výživa hraje důležitou roli v prevenci či vzniku mnoha onemocnění. Součástí našeho života je kyslík, a přestože je pro život nepostradatelný, tak jeho oxidační vlastnost hraje v našich životech zásadní roli. Ačkoli je kyslík nezbytný pro biologické reakce, může také zhoršovat poškození uvnitř buňky oxidačními pochody. Kyslík naše tělo používá k výrobě energie, kdy současně vznikají

volné radikály jako důsledek produkce adenosintrifosfátu (ATP) v mitochondriích. Reaktivní kyslík (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS) vznikají v důsledku buněčné redoxní reakce jako vedlejší produkty. Tyto sloučeniny hrají v lidském těle dvojí roli, jsou totiž prospěšné i toxické. Je to právě rovnováha mezi těmito sloučeninami, která patří ke klíčovým aspektům života. Při nízké kontrolované hladině reaktivních druhů můžeme pozorovat příznivý vliv na buněčnou redoxní signalizaci a imunitní systém, avšak je-li koncentrace vysoká dochází ke vzniku oxidačního stresu, který imunitní systém oslabuje.

Oxidační stres vyvolaný volnými radikály je považován za základní příčinu oxidačního stresu a primárním mechanismem vzniku řady chorob, například onemocnění kardiovaskulárního či neurologického systému. Antioxidanty tak tvoří podstatnou část naší obranyschopnosti proti volným radikálům a mají zásadní význam pro udržení optimálního zdraví a pohody. Odhadem přibližně 5 % vdechovaného kyslíku se přeměňuje na několik škodlivých forem ROS, jimiž jsou superoxid (O_2^-), hydroxyl ($-OH$) a peroxid vodíku (H_2O_2).

V dnešním moderním světě se zvyšuje pravděpodobnost rizika vzniku onemocnění oxidačními vlivy, je totiž podpořena nezdravým životním stylem, působením chemikálií a znečištěním, kouřením cigaret, užíváním drog, stresem a dalšími vlivy. Exogenní konzumace antioxidantů z rostlinných, živočišných i minerálních zdrojů je tedy velmi prospěšná součást stravy člověka.

Několik studií uvádí, že nízký příjem antioxidantů nebo nízká hladina antioxidantů v krvi zvyšuje riziko onemocnění. Stejně tak nízký příjem ovoce a zeleniny ve stravě dokáže až zdvojnásobit vznik rakovinového onemocnění. Proto by měla plnohodnotná strava obsahovat dostatečné množství ovoce a zeleniny nebo by mě být příjem kompenzován doplňky stravy.

Vedlejší produkty ROS a RNS vznikají v důsledku buněčného redoxního procesu, kdy v organismu mohou působit pozitivně i negativně. Přestože vznik reaktivních forem je přísně regulován enzymatickými i neenzymatickými mechanismy antioxidantů, může dojít k nadprodukci ROS, tudíž vzniku oxidačního stresu, který poškozuje lidský organismus. Mezi poškození patří defekt buněčných struktur, lipidů, membrán, bílkovin a v neposlední řadě DNA (Andreescu & Hepel 2011).

3.3.1 Zdroje volných radikálů

Volné radikály jsou definovány jako molekuly či jejich fragmenty, které obsahují jeden volný radikál či více nepárových elektronů na vnějším orbitu. Tyto nespárované elektrony nejsou stabilní a většinou tak dávají značný stupeň reaktivity volnému radikálu. Zástupci ROS radikálů jsou například superoxid (O_2^-), hydroxylová skupina ($-OH$), peroxyová skupina (ROO^-), lipidový peroxy (LOO^-) a alkoxy skupina (RO^-). K dusíkatým volným radikálům řadíme oxid dusnatý (NO^-) a oxid dusičitý (NO_2). ROS a RNS lze snadno přeměnit na jiné, neradikálové, reaktivní formy, jež jsou také zdraví nebezpečné. Látky, které nejsou volnými radikály, se označují jako oxidanty a velmi často vedou ke vzniku reakcí volných

radikálů v organismech jsou například vodík, peroxid vodíku (H_2O_2), ozon (O_3), singletový kyslík (1O_2), kyselina chlorná ($HOCl$), kyselina dusičná (HNO_2), peroxyinitrit ($ONOO^-$), oxid dusičitý (N_2O_3) a lipidové peroxidy ($LOOH$) (Phaniendra et al. 2015).

Zdroje radikálů:

- Imunitní systém – Buňky imunitního systému vytvářejí oxy-radikály a ROS molekuly v důsledku reakce na patogeny.
- Metabolický proces – Volné radikály vznikají při přeměně kyseliny arachidonové, krevních destiček, makrofágů a hladkých svalových buněk.
- Zánět – Zanícení uvolňuje cytokiny a iniciuje neutrofile s makrofágy k produkci volných radikálů.
- Stres – Tento jev může vyvolat tvorbu volných radikálů jako vedlejší toxický produkt. Hormony, které regulují stres v těle, kortizol a katecholamin, degenerují na destruktivní volné radikály
- Znečištění – Různé typy chemikálií, které se vyskytují v prostředí (azbest, benzen, čisticí prostředky, chloroform a další) jsou významným generátorem volných radikálů.
- Radiace – UV záření, lékařské rentgenové záření, gama záření a mikrovlnné záření může vést ke vzniku volných radikálů.
- Strava – Potraviny obsahující přídatné látky, alkohol, kávu, herbicidy či třeba cukr mohou vytvářet velké množství volných radikálů.
- Toxiny a drogy – Přítomnost toxických chemikálií, léků a drog vede ke zvýšení produkce volných radikálů.
- Další faktory – Mezi tyto faktory patří například výfukové plyny a kouření tabáku.

Jak můžeme vidět, seznam radikálů, které se kolem nás vyskytují, je v moderním světě velmi široký. Proto se velmi často stává, že dojde ke značnému nahromadění radikálů v lidském těle (Andreescu & Hepel 2011).

3.3.2 Účinky resveratrolu na lidské zdraví

Antioxidanty mohou plnit svou ochranou funkci proti volným radikálům různými mechanismy a tím napomáhat tělu, aby zůstalo zdravé a bez nemocí. Resveratrol je nutraceutikum s polyfenolickými účinky, jež vykazuje pleiotropní efekt u lidí. Jeho účinnost, bezpečnost a farmakokinetika byla zdokumentována ve více než 244 ukončených klinických studiích. Nové studie zabývající se tímto tématem stále vznikají a probíhají. Mezi jeho četné potenciální benefity patří zlepšení zdravotního stavu u pacientů s onemocněním diabetes mellitus, obezitou, kolorektálním karcinomem a karcinomem prsu, mnohočetným myelomem, metabolickým syndromem, hypertenzí, Alzheimerovou chorobou, mrtvicí, kardiovaskulárním onemocněním, onemocněním ledvin a zánětlivým onemocněním (Singh et al. 2019).

3.3.2.1 Kardiovaskulární onemocnění

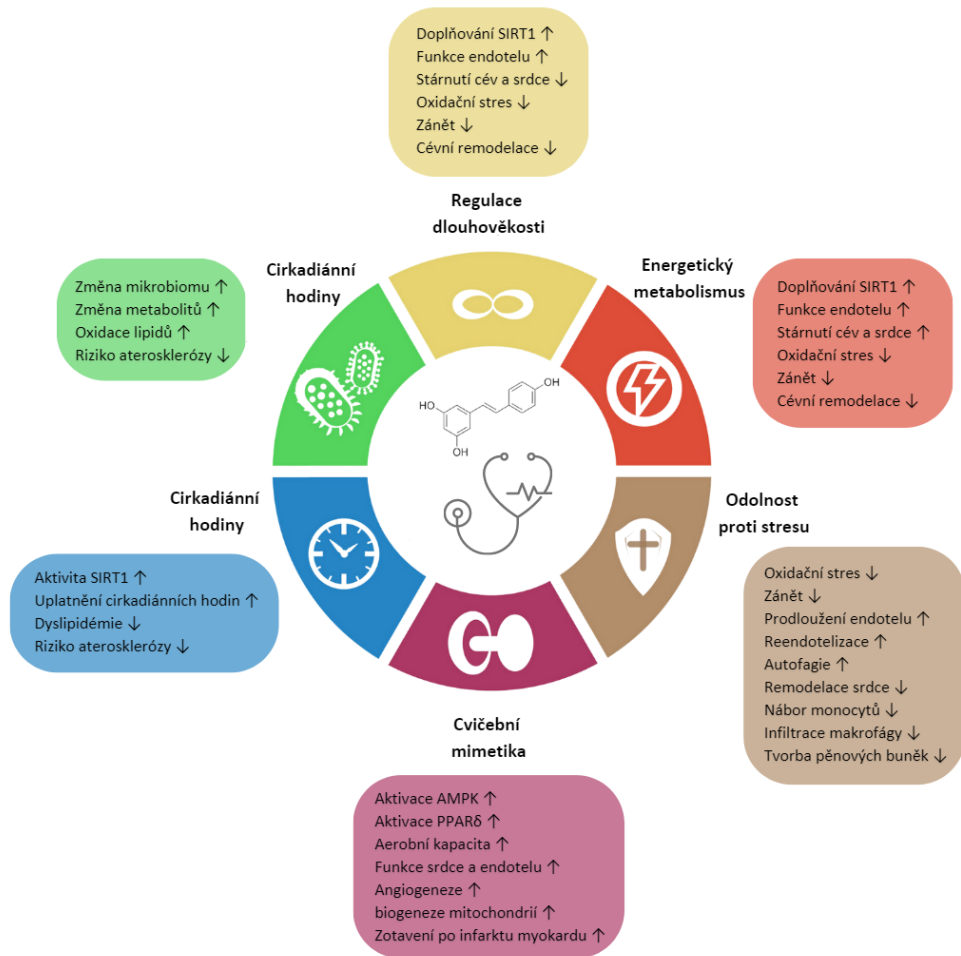
Resveratrol má široké spektrum pozitivních účinků mezi které patří i kardioprotektivní působení. Nedávné důkazy naznačují, že i při krátkodobé kalorické restrikci asistované resveratrolem, dochází k bezpečné a účinné léčbě kardiovaskulárních onemocnění (Dolinsky & Dyck 2011). Tato benefiční látka se do těla dostává jako součást potravy, snadno dostupná je v potravinách a nápojích, také existují doplňky stravy a farmaka. Po vstupu stilbenu do krevního oběhu je velmi snadno vstřebán endotelovými buňkami cév pomocí pasivní difúze či aktivním transportem zprostředkovaným SGLT1 (sodíkovo-glukózový kotransportér). Kromě toho, že může fungovat jako tzv. strážce první linie cévní stěny, tak resveratrol může působit i na monocyty a makrofágy typu M1/M2 za účelem modulace zánětlivých profilů. Taktéž působí na buňky hladkého svalstva cévního za účelem regulace proliferace a apoptózy či na kardiomyocytech potlačuje vysoký oxidační stres.

Funguje také jako aktivátor SIRT1 (Sirtuin 1), NAD⁺ dependentního proteinu, který reguluje stárnutí, transkripci, proliferaci, apoptózu a zánět. Během procesu stárnutí dochází k postupné ztrátě exprese SIRT1 v kardiomyocytech, endoteliálních a cévních buňkách, což má za následek stárnutí cév i srdce. Resveratrol tedy slouží jako farmakologický imitátor pro omezení příjmu kalorií čímž aktivuje SIRT1 a následně dochází k modulaci enzymové aktivity, fosforylace proteinů a funkce transkripčních faktorů. Dohromady tak tvoří základ pro vazodilatační, antioxidační, protizánětlivé a antiapoptické vlastnosti, které benefitují kardiovaskulárnímu systému (Cheng et al. 2020). V následující tabulce vidíme přehled účinku resveratrolu při klinických studiích na kardiovaskulární onemocnění (Singh et al. 2019).

Tabulka č. 5: Výsledky publikovaných klinických studií s resveratrolem u kardiovaskulárních chorob, (Upraveno (Singh et al. 2019))

Klinický stav	Počet pacientů	Dávka	Přehled výsledků
Primární KVO	75	Kapsle, 6 měsíců	Výrazné snížení hladiny cholesterolu a Apo-B157
Pacienti s rizikem vzniku KVO	1000	Dieta, délka neurčitá	Zlepšení profilu krevních lipidů a snížení hladiny glukózy v krvi nalačno
Infarkt myokardu	40	10 mg/d, 3 měsíce	Zlepšení diastolického stavu levé srdeční komory a endoteliální funkce, snížení LDL162
Zdravý jedinec	44	400 mg/d, 1 měsíc	Výrazně snížená exprese ICAM, VCAM a koncentrace inzulinu nalačno

Na následujícím obrázku (Obrázek č. 11) jsou popsány jednotlivé benefity resveratrolu na kardiovaskulární systém.



Obrázek č. 11: Příznivé účinky resveratrolu na kardiovaskulární systém,

(Upraveno (Cheng et al. 2020))

3.3.2.2 Onkologická onemocnění

Klinické a preklinické studie naznačují, že rakovina je primárně způsobena poruchou regulace více genů. Léčiva vyvíjená proti rakovině jsou však navržena tak, že působí na jediný cíl. Avšak vzhledem ke složitosti povahy rakoviny je žádoucí nalézt látky se schopností modulovat více genů a drah. V tomto ohledu se ukazuje resveratrol jako látka, která má víceúčelové vlastnosti. Může tak ovlivňovat širokou škálu receptorů, transkripčních faktorů, enzymů či kináz. Tento vliv může mít buď přímo či nepřímo, což vede k několika biologickým důsledkům. Vliv resveratrolu byl zaznamenán především u rakoviny tlustého střeva, rakoviny prsu a mnohočetného myelomu.

V klinické studii, které se zúčastnilo 40 zdravých jedinců, byla testována bezpečnost a účinnost resveratrolu při příjmu v malých dávkách (0,5; 1; 2,5; 5 g/den) po dobu 29 dní. Výsledkem bylo nejen zjištění, že je resveratrol bezpečný, ale taktéž že snižuje cirkulující hladiny IGF-1 a IGFBP-3, jež jsou spojeny s několika typy rakoviny (Singh et al. 2019).

V následující tabulce jsou popsány mechanismy účinku u jednotlivých onemocnění v jednotlivých studiích.

Tabulka č. 6: Výsledky publikovaných klinických studií s resveratrolem u rakovinového onemocnění, (Upraveno (Singh et al. 2019))

Klinický stav	Počet pacientů	Dávka	Přehled výsledků
Karcinom tlustého střeva	8	80 a 20 mg/d, 14 dní	Zvýšená regulace myc, axin11 a cyklinu D1; snížená regulace CD133 a LGR5 v normální sliznici tlustého střeva
Kolorektální karcinom	9	5 g/d, 14 dní	Zlepšená biologická dostupnost, dobrá snášenlivost a jaterní metastázy zvýšené štěpení kaspázy-3 v maligní jaterní tkáni
Mnohočetný myelom	24	5 g/d, 20 dní	Vyvolané nežádoucí příhody u pacientů
Karcinom prsu	39	10-50 mg/d, 12 týdnů	Potlačení metylace RASSF-1α u onkologických pacientů

3.3.2.3 Alzheimerova choroba

Tato choroba patří k nejčastějším onemocněním, které mají velký dopad na vznik demence a úmrtnost u starších osob. Alzheimerova choroba je patologicky definována hustotou a distribucí β -amyloidových plaků v centrálním nervovém systému (CNS) a intracelulárními plaky neurofibrilární spleti (Ahmed et al. 2017). Dochází k postupnému štěpení β -amyloidu a ukládání jeho fragmentů.

Mezi léky, které se používají, patří inhibitory cholinesterázy, například donepenzil, rivastigmin a galantamin. Také se používá antagonist N-methyl-aspartátových receptorů memantin. Účinek je založen na cholinergní neurotransmisi či blokaci excitotoxického poškození. Vliv těchto léků je pouze částečný a dočasný s paliativními přínosy.

Rizikovým faktorem číslo jedna je staří. Proto se zde využívá tzv. kalorická restrikce, což představuje mírné stresové omezení kalorií. Příjem se může snížit maximálně o 1/3 z celého kalorického příjmu.

Podobně jako u restrikce příjmu, mají své benefiční vlivy i bioaktivní látky. Proto zde nalézá své uplatnění právě resveratrol, který patří k nejsilnějším aktivátorům SIRT1. Sirtuin 1, taktéž označovaný jako NAD⁺ – dependentní proteinová deacetyláza, je represorem genů, které ovládají ukládání tuků. Léčba resveratrolem snižuje na věku závislý úbytek kognitivních funkcí a patologické stavy podobné Alzheimerově chorobě. Tento typ léčby se však zatím nevyužívá a je součástí preklinických studií. Tyto studie však vykazují příznivé účinky regulující stárnutí spojené s oddálením nebo prevencí nemocí spojenými se stářím (Sawda et al. 2017).

Na níže přiložené tabulce vidíme přehled pozitivních mechanismů resveratrolu vzhledem k Alzheimerově chorobě.

Tabulka č. 7: Přehled mechanismu účinku resveratrolu vzhledem k Alzheimerově chorobě, (Upraveno, (Ahmed et al. 2017))

Působení resveratrolu	Mechanismy účinku
Inhibice Tauopatie*	Zvýšená regulace genu BAG2
Posílení tvorby dlouhodobé paměti	Zvýšení hladiny BDNF (mozkový neurotický faktor, který podněcuje růst mozkových buněk)
Posílení neuroprotektivní aktivity sirtuinu-1	Zvýšení hladiny a aktivace SIRT1
Inhibice syntézy plaku β -amyloidu	Obnovení normální buněčné autofágie

*Tauopatie jsou neurodegenerativní onemocnění charakterizovaná ukládáním abnormálního tau proteinu v mozku.

3.3.3 Francouzský paradox

Jev, francouzský paradox, byl objeven a pojmenován již v minulém století v roce 1992. Došlo k observanci nízkých hodnot smrtnosti na ischemickou chorobu srdeční (ICHS) ve Francii i přes vysoký příjem nasycených tuků ve stravě. Autor této teorie, Serge Renaud, se domníval, že existuje korelace mezi příjmem stravy bohaté na nasycené tuky a konzumací alkoholu, obzvláště červeného vína (Haseeb et al. 2017). V rámci studie organizované Světovou zdravotnickou organizací (WHO), bylo zjištěno, že poměr úmrtnosti na kardiovaskulární onemocnění je ve Francii dvakrát až třikrát nižší než v ostatních zemích, např. USA, Velká Británie a Švédsko. Na základě těchto informací byla v Kodani uspořádána studie, které se účastnilo 6051 mužů a 7234 žen ve věku 30–70 let. V této studii bylo zjištěno, že nižší až středně vysoká konzumace vína měla redukující vliv na úmrtnost na kardiovaskulární a cerebrovaskulární onemocnění.

Velké množství klinických studií a studií na zvířatech naznačuje, že resveratrol může mít pozitivní vliv na lidský organismus. Nicméně navzdory velkému množství nepřímých a experimentálních důkazů nelze definitivně potvrdit protektivní účinky resveratrolu na lidské tělo (Catalgol et al. 2012).

3.3.4 Kalorická restrikce

Restrikce kalorií má pozitivní vliv na velké množství organismů. Omezení množství přijatých kalorií prodlužuje délku života a přináší sebou metabolické výhody. Pro úspěšnost tohoto typu přístupu je esenciální správně nastavená dieta (Lam et al. 2013). Restrikce příjmu je jedna z nejúčinnějších výživových opatření, které prokazatelně chrání před obezitou, cukrovkou a kardiovaskulárním onemocněním (Dolinsky & Dyck 2011). Indukovaná kalorická restrikce také snižuje riziko aterosklerózy, tvorbu zánětů či inzulinovou rezistenci tukové tkáně. Resveratrol a látky strukturně podobné mají též pozitivní vliv na snižování hladiny cukru v krvi (Delmas et al. 2005).

V současné době existuje několik přesvědčivých důkazů o využití suplementace resveratrolu jako potencionální alternativy omezení příjmu kalorií. Resveratrol aktivuje SIRT1 a s tím spojenou lepší využitelnost energie. Současné výzkumy podporují využití resveratrolu jako potencionální mimetikum (látka s napodobujícím účinkem jiných látek či jejich dějů v organismu) pro kalorickou restrikcí ke zlepšení metabolického i funkčního zdraví. Je důležité věnovat tomuto tématu více studií, které jsou zásadní pro získání informací o jeho dlouhodobém přínosu pro zdraví (Lam et al. 2013).

3.4 Legislativní požadavky

Pro skupinu doplňků stravy a léčiva platí rozdílná legislativní požadavky a také se může lišit jejich výsledná cena, kvalita a bioaktivita. V této práci se zaměřuji na resveratrol ve farmakologické kvalitě, z tohoto důvodu zde naleznete krátký výňatek legislativních požadavků týkajících se těchto dvou skupin. Hranice mezi těmito skupinami a jednotlivými kategoriemi může být velmi úzká a je tak důležité věnovat se každému produktu zvlášť.

3.4.1 Požadavky na doplňky stravy

*„Podle zákona č. 110/1997 Sb., v platném znění, se **doplňkem stravy** rozumí potravina, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu a která je koncentrovaným zdrojem vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravině samostatně nebo v kombinaci, určená k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích.*

*Podle směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 2002/46/ES jsou **doplňky stravy** potraviny, jejichž účelem je doplňovat běžnou stravu a které jsou koncentrovanými zdroji živin nebo jiných látek s výživovým nebo fyziologickým účinkem, samostatně nebo v kombinaci, jsou uváděny na trh ve formě dávek, a to ve formě tobolek, pastilek, tablet, pilulek a v jiných podobných formách, dále ve formě sypké, jako kapalina v ampulích, v lahvičkách s kapátkem a v jiných podobných formách kapalných nebo sypkých výrobků určených k příjmu v malých odměřených množstvích.*

*Doplňky stravy v rámci ČR tvoří samostatnou kategorii potravin, která je upravena **vyhláškou č. 58/2018 Sb.**, o doplňcích stravy a složení potravin, ve znění pozdějších předpisů. Tato vyhláška vznikla transpozicí směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 2002/46/ES.*

Označování doplňků stravy:

- *nesmí prisuzovat doplňkům stravy vlastnosti týkající se prevence, léčby nebo vyléčení lidských onemocnění nebo odkazovat na tyto vlastnosti,*
- *nesmí obsahovat žádné tvrzení uvádějící nebo naznačující, že vyvážená a pestrá strava obecně nemůže poskytnout dostatečné množství vitaminů nebo minerálních látek,*
- *výživová a zdravotní tvrzení se mohou uvádět za podmínek stanovených nařízením (ES) č. 1924/2006“ (Státní zemědělská a potravinářská inspekce, 2019)*

3.4.2 Požadavky na léčiva

Zákon č. 378/2007 Sb. o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů, nyní aktualizován zákonem č. 314/2022 Sb. říká, že:

„(1) Léčivým přípravkem se rozumí

a) látka nebo kombinace látek prezentovaná s tím, že má léčebné nebo preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí nebo zvířat, nebo

b) látka nebo kombinace látek, kterou lze použít u lidí nebo podat lidem, nebo použít u zvířat či podat zvířatům, a to buď za účelem obnovy, úpravy či ovlivnění fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku, nebo za účelem stanovení lékařské diagnózy.

(3) Látkou se rozumí jakákoli látka bez ohledu na její původ, který může být

a) lidský, například lidská krev, její složky a přípravky z lidské krve,

b) živočišný, například mikroorganismy, toxiny, celí živočichové, části orgánů, živočišné sekrety, extrakty nebo přípravky z krve,

c) rostlinný, nebo

d) chemický.

(4) Za látku podle odstavce 3 se zejména považuje

a) léčivá látka, kterou se rozumí jakákoliv látka nebo směs látek určená k použití při výrobě nebo přípravě léčivého přípravku, která se po použití při této výrobě nebo přípravě stane účinnou složkou léčivého přípravku určenou k vyvinutí farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku za účelem obnovy, úpravy nebo ovlivnění fyziologických funkcí anebo ke stanovení lékařské diagnózy,

b) pomocná látka, kterou se rozumí jakákoliv složka léčivého přípravku, která není léčivou látkou nebo obalovým materiálem.“ (Zákon pro lidi, 2010-2023)

3.5 Metoda HPLC-MS

Zkratka HPLC-MS představuje metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Metoda analýzy využívající chromatografickou techniku za účelem separace jednotlivých složek vzorku s jejich následnou analýzou. Výhodou této metody je vysoká účinnost, dobrá opakovatelnost a robustnost. Ve spojení s hmotnostní

spektrometrií tak tvoří standardní instrumentaci pro kvantitativní analýzu známých látek i při nízké koncentraci (Moldoveanu & David 2016). Na následujících obrázcích můžeme vidět přístroje používané k analýze HPLC-MS. Na obrázku č. 12 vidíme přístroj – hmotnostní spektrometr, který byl použit při analýze. Obrázek č. 13 zobrazuje chromatografický systém použitý při analýze dat v této diplomové práci.



Obrázek č. 12: Hmotnostní spektrometr – 3200 Q-Trap, (Mass spectrometers 2023)



Obrázek č. 13: Chromatografický systém HPLC – Ultimate 3000, (HPLC Standard Systems 2006-2023)

4 Metodika

V předkládané diplomové práci bylo zkoumáno několik na sebe navazujících úkonů, a to především vývoj metodiky a následné stanovení stilbenoidů v různých částech rostliny Křídlatky japonské. Stanovení se skládalo ze dvou kroků, a to příprava rostlinné matrice pro analytické stanovení a vlastní HPLC-MS metodu. Cílem této práce bylo stanovit následující stilbeny – resveratrol, piceid, emodin a jeho glukosid. Při přípravě resveratrolu jako potravinového doplňku je kontrolován obsah emodinu a emodin glukosidu, jelikož mohou na lidský organismus působit toxicky (například vyvolávat zažívací obtíže) a jsou kontrolovány legislativními orgány – Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí – a jsou regulovány na hladiny nejvyšších přípustných limitů.

4.1 Stanovení antioxidantů

4.1.1 Použité chemikálie

K analýze antioxidantů v rostlinných matricích pomocí metody HPLC-MS jsem použila tyto chemikálie:

- | | |
|------------------------|---------------------------------|
| • Methanol p.a. | CH ₃ OH |
| • Acetonitril | H ₂ SO ₄ |
| • Voda miliQ | H ₂ O |
| • Kyselina sírová p.a. | H ₂ SO ₄ |
| • Diethylether p.a. | C ₂ H ₅ O |
| • Chloroform p.a. | CHCl ₃ |
| • Hydroxid amonný | NH ₄ OH |
| • Síran hořečnatý | MgSO ₄ |

Výrobce chemikálií je Fisher Scientific, pouze voda miliQ je z České Zemědělské Univerzity.

4.1.2 Použité přístroje k přípravě vzorků

- Třecí miska s tloučkem
- Analytická laboratorní váha
- Ultrazvuková lázeň
- Vakuová odparka
- Elektrický mlýnek
- Dělicí aparát: dělicí nálevka, kruh, stojan, kádinka
- Filtrační aparát: fritka, odsávací baňka, pojistná lahev, vodní vývěva, gumové propojení

4.1.3 Příprava vzorků z rostlinných matric

Příprava vzorků probíhala ve dvou různých variantách. První druh přípravy byl realizován pomocí rozetření různých částí rostliny – kořen, stonek, list v třecí misce. Následovalo navážení 2 g příslušné části rostliny, kdy polovina byla předložena do extrakce a druhá část sloužila ke stanovení sušiny a byla přemístěna do žíhacího kelímku a vložena do sušárny a ponechána sušit do konstantní hmotnosti při teplotě 70°C. První část byla přesunuta do plastové zkumavky o objemu 50 ml s uzávěrem a předložena dále k extrakci. Následně se do zkumavky přidalo 25 ml methanolu (nebo směs voda-acetonitril 50:50 či směs voda-methanol 50:50) a uzavřená zkumavka byla umístěna do ultrazvukové lázně na 20 minut. Methanolvý podíl byl přefiltrován pomocí odsávací baňky s fritou. Čistý a přefiltrovaný podíl byl přelit do čisté kádinky a opět byl ke vzorku přidán methanol o objemu 25 ml a následovala 20minutová ultrazvuková lázeň. Poté byl vzorek opět vyfiltrován. Tento postup byl zopakován ještě jednou stejným způsobem. Takto vzniklé tři podíly byly sloučeny, přefiltrovány odsávací baňkou s fritou a přelity do 250 ml baňky, jež byly umístěny do vakuové rotační odparky k odpaření do sucha. Při použití tohoto typu extrakce byly použity 3 druhy chemikálií jako extraktanty – methanol, směs voda-acetonitril (50:50) a směs vody s methanolem v poměru 50:50.

Druhým způsobem přípravy byla kryogenizace vzorku, kdy byl odvážený 0,5 g vzorku v třecí misce a následně přelit tekutým dusíkem. Díky vlastnostem tekutého dusíku došlo k jednoduchému rozetření vzorku na malé až prachové částice. Zbytek, který vznikl po odpaření dusíku byl rozpuštěn ve směsi methanol-voda (50:50) a vložen na 20 minut do ultrazvukové lázně. Následovala filtrace vzorku na keramické fritě a kapalný podíl byl vložen do vakuové odparky. Poté byl destilační zbytek rozpuštěn v 1 ml methanolu a tím připraven pro vlastní analýzu na přístroji HPLC-MS.

Vzorky byly skladovány při teplotě 4 °C v chladničce, protože *trans*-resveratrol je velmi fotosenzitivní a mění se po vystavení světlu na izomer *cis*-resveratrol. Rostlinné vzorky byly dodány firmou InterPharma Praha.

4.1.4 Příprava roztoků referenčních látek

Resveratrol v *trans*- a *cis*- formě, stejně tak piceid a jeho izomery jsou spolu s emodinovými deriváty přítomny v Křídlatce japonské, takže byly komerčně získávány a použity jako referenční látky v této studii. Zásobní roztoky jednotlivých izomerických variant testovaných látek byly připraveny rozpuštěním jejich standardů v methanolu na finální koncentraci (0,20 µg/ml). Takto vzniklé zásobní roztoky byly přefiltrovány přes 0,45 µm Millipore filtr a využity jako referenční látky pro HPLC-MS analýzu.

4.1.5 Stanovení stilbenoidů pomocí HPLC-MS analýzy

Kvalitativní a kvantitativní stanovení stilbenoidů, především *trans*- a *cis*-resveratrolu, *trans*- a *cis*-piceidu, emodinu a emodin-glukosidu bylo uskutečněno pomocí metody kombinující separační techniky, konkrétně vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií spolu s metodou detekční – hmotnostní spektrometrií.

4.1.5.1 Analytické podmínky HPLC-MS systému

Instrument:	I, Hmotnostní spektrometr – 3200 Q-Trap (Applied Biosystems, Kanada) II, Chromatografický systém HPLC – Ultimate 3000 (Di-ionex, USA) III, Analytická HPLC kolona – Synergi Fusion-RP 10, 100 x 2,0 mm, 2,5 µm (Phenomex, USA)
Ionizace:	ESI (+), pozitivní ionizační mód
Skenovací režim:	Full Scan – 80-1500 Da
Průtok kolonou:	200 µl/min
Primární infúze:	10 µl/min roztoku vzorku o koncentraci 100 µl/ml (optimalizace MRM přechodů)
Teplota kolony:	40 °C
Objem nástřiku:	5 µl
Doba analýzy:	25 min
Ion Spray Voltage:	IS = 5500 V
Curtain gas:	CUR = 25 psi
Collision gas:	CAD = medium
Teplota:	600 °C
Ion source gas 1:	GS1 = 50 psi
Ion source gas 2:	GS2 = 50 psi

Parametry MRM přechodů:

Tabulka č. 8: Přehled MRM přechodů pro jednotlivé látky

Název látky	Prekurzorový ion	Produktový ion	Declustering potential (DP) [V]	Entrance potential (EP) [V]	Cell Entrance Potential (CEP) [V]	Collision Energy (CE) [V]
<i>Trans</i> -Resveratrol	228,24	143,19	53	12	15	50
<i>Cis</i> -Resveratrol	228,24	143,19	53	12	15	50
<i>Trans</i> -Res. Glukosid (<i>Trans</i> -Piceid)	403,27	227,21	53	12	15	Přechod 24
<i>Cis</i> -Res. Glukosid (<i>Cis</i> -Piceid)	403,27	227,21	53	14	17	Přechod 22
Emodin	270,25	225,18	58	15	17	35
Emodin-glukosid	432,41	198,22	58	15	17	35

4.1.6 Příprava vzorků pro HPLC-MS analýzu

4.1.6.1 Příprava extrakční metodou

Pro extrakci bylo naváženo 2 g rozmělněného vzorku v 50 ml zkumavce typu falcon, k vzorku bylo přidáno 25 ml směsi ethanolu a ethylacetátu v poměru 1:1. Poté byly vzorky ponechány ve tmě po dobu 18 hodin. Následovala 10minutová sonifikace a centrifugace pro 6 000 G (centrifuga 5810R, Eppendorf AG, Německo). Supernatant byl přenesen do kulaté baňky o objemu 50 ml. Extrakce byla dvakrát opakována s 5 mililitry směsi methyl-ethylacetát. Veškerý extrakt je odpařen do sucha ve vakuové odparce typu R-200 (Büchni Labortechnik AG, Švýcarsko) při teplotě 40 °C. Takto vysušený extrakt je znovu rozpuštěn ve 4 ml 100% methanolu a následně filtrován přes 0,22 µm PVDF injekční filtr. Takto připravený roztok extraktu je připraven na analýzu pomocí HPLC-MS.

4.1.6.2 Příprava kryogenní metodou

Pro tuto metodu je také naváženo 0,5 g vzorku v původním stavu, který je následně vložen do třecí misky, která je předem ponořena do kapalného dusíku a tím vychlazena. Do takto připravené misky se vzorkem je přidáno přibližně 10 ml kapalného dusíku a třecím válečkem je vzorek rozetřen na velmi jemný prach. V případě potřeby byl přidán další tekutý dusík až do úplného rozemletí vzorku. Tento jemný prášek je následně smíchán se 4 ml 100 % methanolu a řádně promíchán. Poté je vzorek zfiltrován přes 0,22 µm PVDF injekční filtr a takto připravený roztok je předložen k analýze na HPLC-MS.

Validační parametry HPLC-MS

Byla provedena validace metody. Nalezené důležité validační parametry jsou zaneseny níže v tabulce.

Tabulka č. 9: Validační parametry HPLC-MS metody

Název sloučeniny	Limit detekce (LOD)	Limit kvantifikace (LOQ)	Linearita	Přesnost (%)	Správnost (%)
<i>Trans-Resveratrol</i>	0,15	0,50	1-10000	0,86	1,63
<i>Cis-Resveratrol</i>	0,25	0,83	1-10000	1,21	1,55
<i>Trans-Piceid</i>	0,03	0,10	1-1000	0,65	0,90
<i>Cis-Piceid</i>	0,05	0,17	1-1000	0,55	0,76
Emodin	0,01	0,03	1-10000	0,45	1,15
Emodin-glukosid	0,01	0,03	1-1000	0,96	1,23

Trans-Resveratrol

- Limit detekce (LOD) 1,2 ng/ml extraktu
- Limit kvantifikace (LOQ) 4,0 ng/ml extraktu

Cis-Resveratrol

- Limit detekce (LOD) 0,1 ng/ml extraktu
- Limit kvantifikace (LOQ) 0,3 ng/ml extraktu

Trans-Piceid

- Limit detekce (LOD) 0,03 ng/ml extraktu
- Limit kvantifikace (LOQ) 0,10 ng/ml extraktu

Cis-Piceid

- Limit detekce (LOD) 0,03 ng/ml extraktu
- Limit kvantifikace (LOQ) 0,10 ng/ml extraktu

Emodin

- Limit detekce (LOD) 2,5 ng/ml extraktu
- Limit kvantifikace (LOQ) 8,3 ng/ml extraktu

Emodin-glukosid

- Limit detekce (LOD) 0,03 ng/ml extraktu
- Limit kvantifikace (LOQ) 0,10 ng/ml extraktu

Interference:

Vzhledem k volbě selektivních MRM přechodů a jejich následným testováním se spikovanými reálnými vzorky a blanky (tzv. kontrolní vzorek), bylo zjištěno, že nedochází k interferenci vzorků.

Rozsah jednodenní („intra-day“) a mezi-denní („inter-day“) přesnosti byl 0,37 – 1,27 %.

Přesnost byla stanovena metodou nejmenších čtverců na 98,53 – 99,10 %, dále byla stanovena relativní směrodatná odchylka o hodnotě 0,55 – 1,63 %.

Optimalizované analytické podmínky:

Byla vyvinuta HPLC-MS metoda, jež splňovala požadavek na ideální separaci. Bohužel doba analýzy se pohybovala kolem 25 minut a ani úpravou podmínek se nepodařilo zkrátit celkový čas analýzy, aniž by nebyla ohrožena kvalita separace všech látek. Podmínky analýzy naleznete níže, spolu s výstupním chromatogramem.

Podmínky analýzy:

Chromatografický systém HPLC Ultimate 300 RS, Dionex, USA

Hmotnostní spektrometr 3200 QTRAP, AB-Sciex, Kanada

Chromatografická kolona a podmínky analýzy:

Chrom. kolona ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)

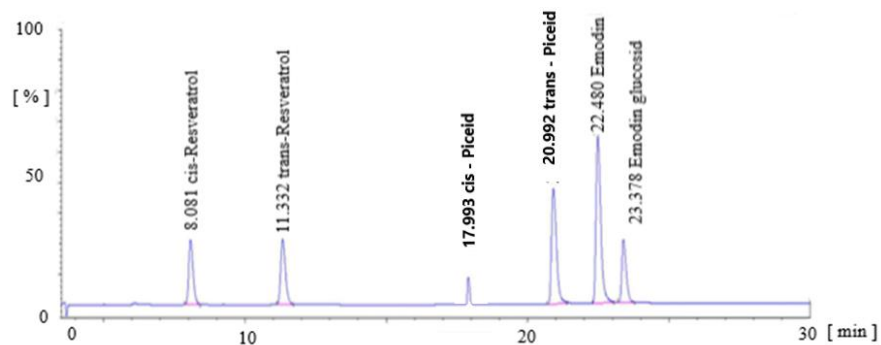
Chrom. předkolona ACQUITY UPLC BEH C18 (5 mm × 2,1 mm × 1,7 μm)

Objem nástřiku 2 μl

Slabý promývací roztok deionizovaná voda-methanol (90:10)

Silný promývací roztok	methanol
Mobilní fáze A	0,1% kyselina octová v deionizovaná vodě
Mobilní fáze B	0,1% kyselina octová v methanolu
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min
Gradient mobilní fáze	0 min → 10 % B 4 min → 100 % B 7 min → 100 % B 7,1 min → 10 % B 10 min → 10 % B

Na obrázku č. 14 je zobrazen chromatogram získaný optimalizací analytické metody, jejíž cílem bylo zajištění separace jednotlivých komponent, které byly monitorovány.



Obrázek č. 14: Chromatogram separovaných komponent

V následující tabulce můžeme vidět jednotlivé retenční časy analytů, které vidíme na výše přiloženém chromatogramu.

Tabulka č. 10: Retenční časy jednotlivých analytů

Analyt	Retenční čas
<i>Cis-Resveratrol</i>	8,08 min
<i>Trans-Resveratrol</i>	11,33 min
<i>Cis-Piceid</i>	17,99 min
<i>Trans-Piceid</i>	20,99 min
Emodin	22,48 min
Emodin-glukosid	23,38 min

5 Výsledky

Realizované měření bylo zaměřeno na stanovení celkového obsahu resveratrolu a dalších antioxidantů v rostlinné matrici Křídlatky japonské. Každá část rostliny (kořen, stonek a list) byla změřena v 10 paralelních opakováních pro každou metodu a následně vypočtena směrodatná odchylka, průměr, minimální a maximální hodnota (Příloha č. 4, 5, 6). Výsledné hodnoty použité pro tvorbu grafů jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty deseti opakování v mg/g rostliny. Data byla zpracována pomocí programu MS Excel a Statistica 12.

5.1 Stanovení obsahu antioxidantů

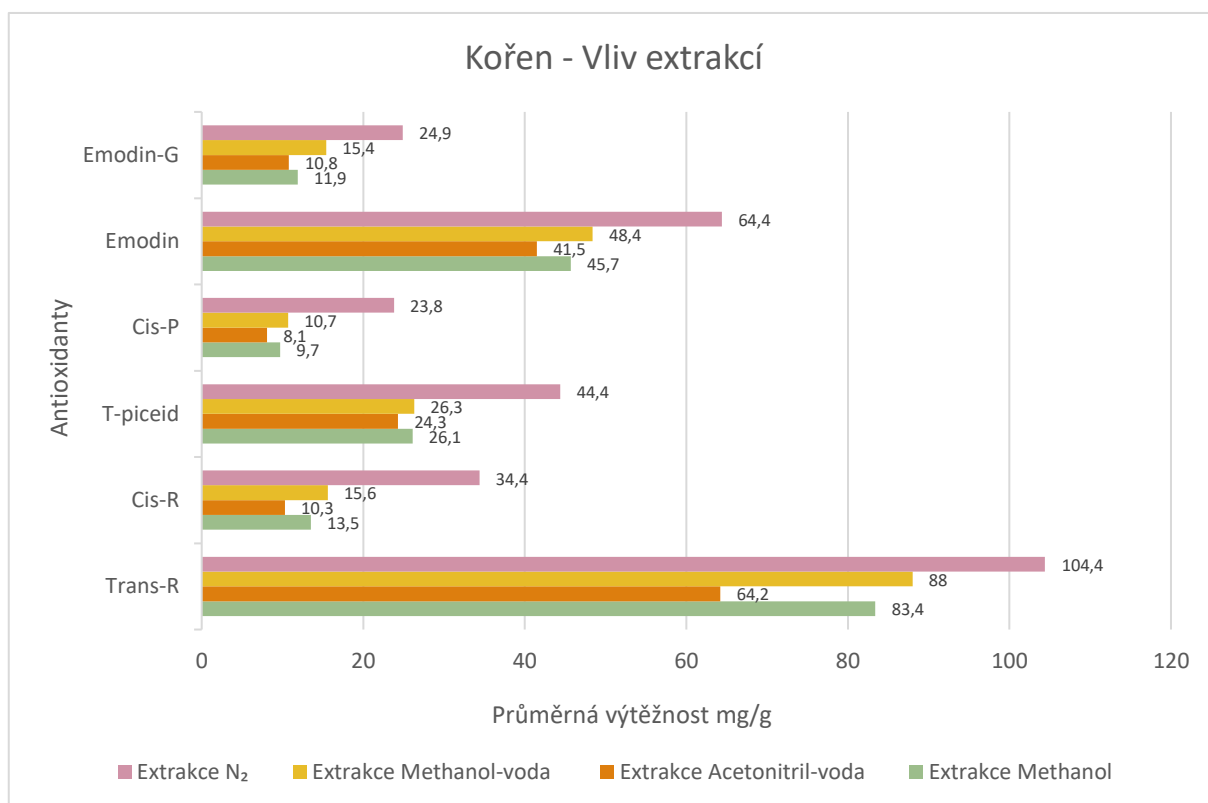
Celkové stanovení obsahu požadovaných antioxidantů jsem rozdělila do jednotlivých podkapitol, které se věnují jednotlivým částem rostliny a v ní obsažených antioxidantů. V následující tabulce nalezneme přehled průměrných hodnot nalezených v jednotlivých částech rostliny. Celkový přehled naměřených hodnot naleznete v příloze.

Tabulka č. 11: Průměrný obsah (mg/g) zkoumaných antioxidantů v jednotlivých částech rostliny

Kořen	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	83,4	13,5	26,1	9,7	45,7	11,9
Extrakce Acetonitril-voda	64,2	10,3	24,3	8,1	41,5	10,8
Extrakce Methanol-voda	88	15,6	26,3	10,7	48,4	15,4
Extrakce N ₂	104,4	34,4	44,4	23,8	64,4	24,9
List	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	8,3	1,4	2,5	1,1	4,8	1
Extrakce Acetonitril-voda	9,4	1,8	2,5	1,1	4,8	1
Extrakce Methanol-voda	10,8	2,7	2,5	1,1	4,8	1
Extrakce N ₂	14,8	4	3,3	2	6,8	1,9
Stonek	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	114,4	22,3	31,9	9,7	45,7	11,9
Extrakce Acetonitril-voda	124,7	34,1	37,7	12,8	54,5	16,4
Extrakce Methanol-voda	127	36,4	40,4	14	56,2	18,2
Extrakce N ₂	138,9	39,8	45,3	15,9	58,2	20,1

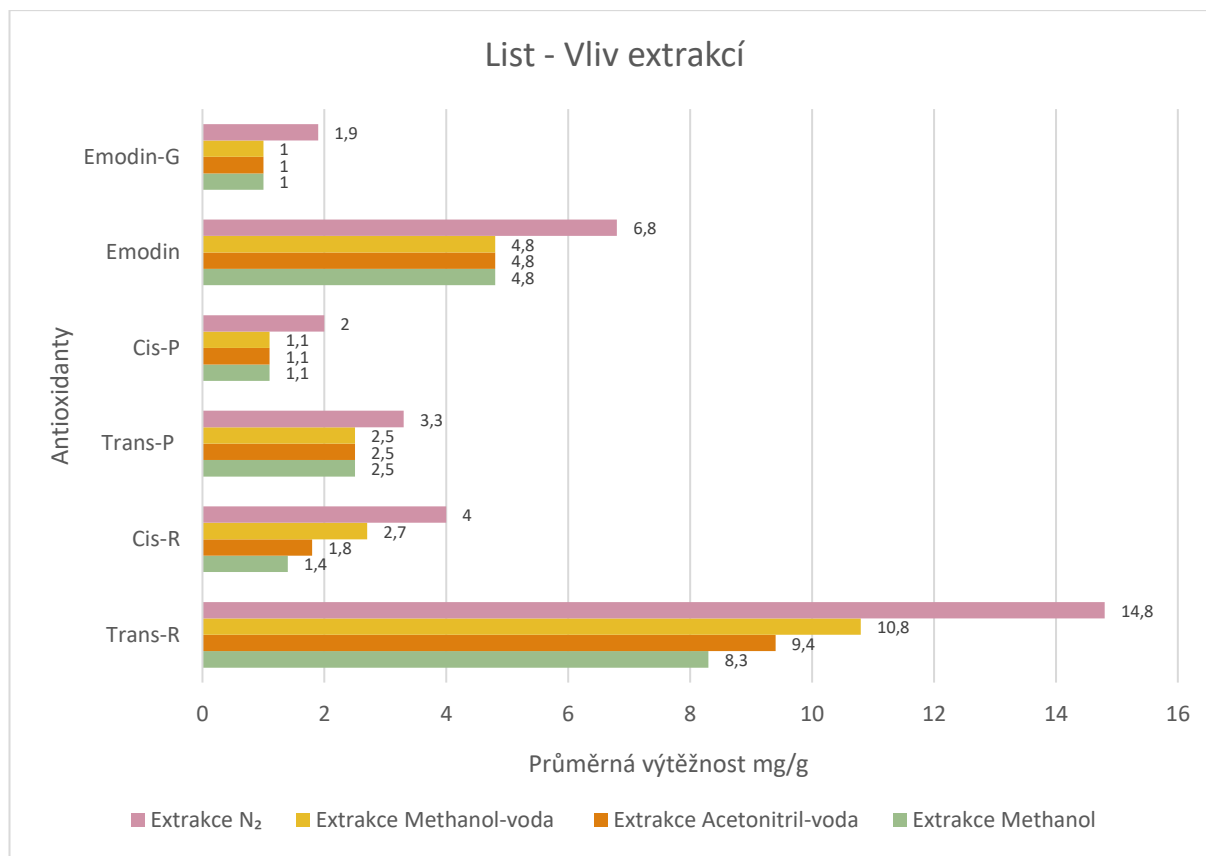
Z průměrných hodnot lze vidět, že nejvyšších obsahů dosahoval *trans*-resveratrol, následuje emodin, *trans*-piceid, *cis*-resveratrol, emodin-glukosid a nejmenší zastoupení měl *cis*-piceid. Větší výtěžnost můžeme pozorovat také u izomerů *trans*– *oproti* izomerům *cis*– a to ať už u resveratrolu, tak i piceidu. Obdobný jev můžeme také pozorovat u emodinu, kdy výtěžnost emodin-glukosidu je skoro třetinová *oproti* emodinu.

Naměřené hodnoty pro jednotlivé typy extrakčních měření jsou zobrazeny v následujících třech grafech. Grafy jsou rozděleny pro jednotlivé části rostlin. Graf č. 1 se věnuje kořenu, graf č. 2 listu a graf č. 3 pojednává o stoncích rostliny.



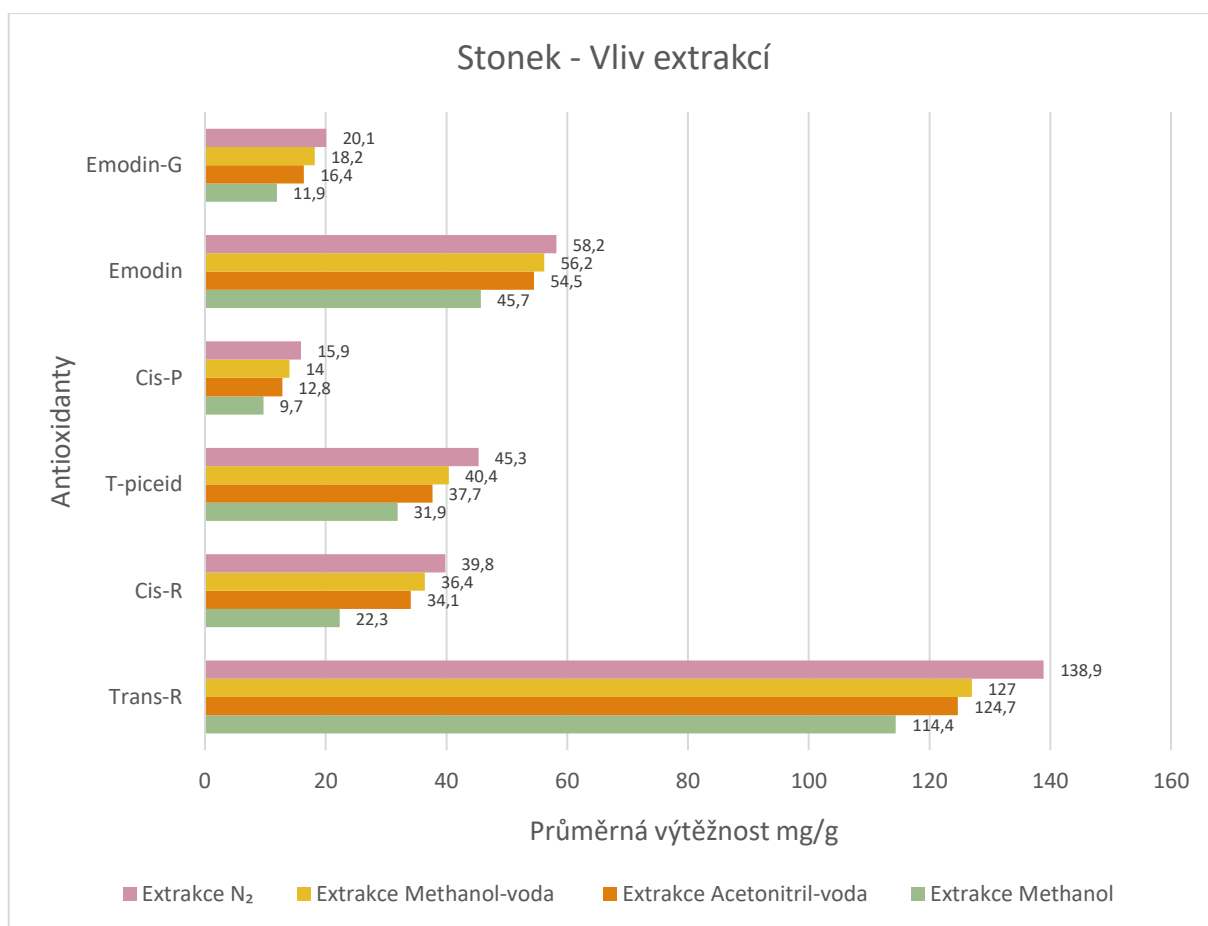
Graf č. 1: Průměrná výtěžnost antioxidantů v kořenech dle druhu použité extrakce

Na tomto grafu jsme schopni sledovat efektivitu různých druhů extrakce v kořenové části u jednotlivých látek. Můžeme pozorovat, že extrakce pomocí tekutého dusíku je nejefektivnější metodou extrakce. Výtěžky získané touto metodou jsou vždy větší než u zbylých typů extrakcí. V případě izomerů resveratrolu je tento rozdíl minimálně o 16,4 mg/g rostliny větší oproti sekundární extrakci pomocí směsi methanolu a vody. Z tohoto grafu lze také vyčíst, že nejslabší výtěžky jsou získány extrakcí směsí acetonitrilu a vody. Co se týče jednotlivých výtěžností látek, největší výtěžnost je u *trans*-resveratrolu, emodinu a *trans*-piceidu.



Graf č. 2: Průměrná výtěžnost antioxidantů v listech dle druhu použité extrakce

V grafu č. 2 můžeme pozorovat průměrnou výtěžnost v listech za použití jednotlivých typů extrakce. Lze pozorovat, že metoda využívající tekutý dusík je značně efektivnější a má vyšší průměrné výtěžky. Nejmenší výtěžnost v mg/g zde pozorujeme u extrakce methanolem. Celkově však lze říci, že výnos z listové části rostliny je výrazně menší, než u zbylých dvou částí.

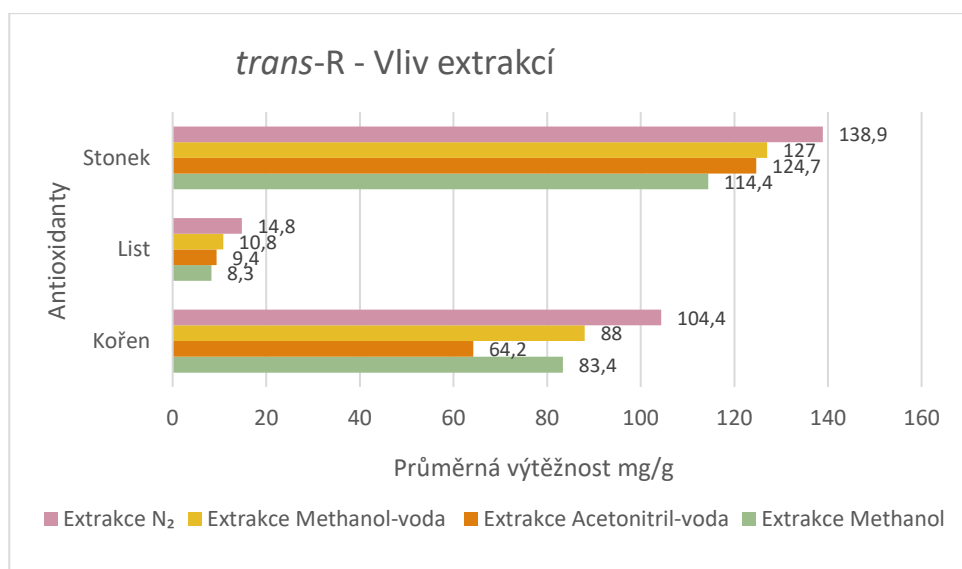


Graf č. 3: Průměrná výtěžnost antioxidantů ve stoncích dle druhu použité extrakce

V posledním souhrnném grafu, který se týká stonkové části rostliny můžeme pozorovat nejvyšší výtěžnost v porovnání se zbylými částmi rostliny. Mezi jednotlivými metodami je nejmenší rozdíl ve výtěžnosti, avšak extrakce pomocí tekutého dusíku je stále nejúčinnější. Zisk *trans*-resveratrolu metodou extrakce s N₂ je v průměru o 11,9 až 24,5 mg/g rostliny větší oproti ostatním metodám. Nejnižší zisky můžeme pozorovat u extrakce pomocí čistého methanolu.

5.1.1 Porovnání výtěžnosti *trans*-resveratrolu dle typu extrakce

V testované rostlině byl nejvyšší obsah *trans*-resveratrolu detekován ve stoncích, a to v rozmezí 114,4 až 138,9 mg/g rostliny, přičemž nejvyšší výtěžnost jsme získali pomocí extrakce N₂. Souhrnné množství z extrakce pomocí tekutého dusíku bylo v průměru 258,1 mg/g rostliny. Naopak si můžeme všimnout na přiloženém grafu níže, že hodnoty získané pomocí extrakce směsí acetonitrilu a vody patří k nejnižším. Průměrný zisk *trans*-resveratrolu byl 198,3 mg/g analyzované rostliny. Což je o 23 % menší výtěžnost ze stejné rostliny. Výtěžnost získaná pomocí extrakce methanolem a směsí methanolu s vodou v poměru 50:50 jsou obdobné ve všech částech rostliny, přičemž lehce převažuje extrakce směsí methanolu a vody.



Graf č. 4: Porovnání účinnosti jednotlivých metod v extrakci *trans*-resveratrolu

5.1.1.1 Výtěžky *trans*-resveratrolu v kořenové části

Tabulka č. 12: Výstup z programu Statistica – Anova, *trans*-resveratrol v kořenové části

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Výtěžnost (Tabulka83) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	289000,0	1	289000,0	6040,409	0,000000
Typ extrakce	8205,6	3	2735,2	57,169	0,000000
Chyba	1722,4	36	47,8		

Tabulka č. 13: Výstup z programu Statistica – Scheffého test, *trans*-resveratrol v kořenové

Č. buňky	Typ extrakce	Scheffého test; proměnná Výtěžnost (Tabulka83) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 47,844, sv = 36,000			
		{1} 83,400	{2} 64,200	{3} 88,000	{4} 104,40
1	Methanol		0,000007	0,536811	0,000001
2	Acetonitril-voda	0,000007		0,000000	0,000000
3	Methanol-voda	0,536811	0,000000		0,000103
4	N ₂	0,000001	0,000000	0,000103	

Dle získaných statistických výsledků z testu Anova, lze usoudit, že mezi jednotlivými typy extrakce existují statisticky významné rozdíly ve výši výtěžku. Tento jev však nelze potvrdit mezi extrakcí methanolem a extrakcí methanol-voda, kdy neexistuje statisticky významný rozdíl.

5.1.1.2 Výtěžky *trans-resveratrolu* v listové části

Tabulka č. 14: Výstup z programu Statistica – Anova, *trans-resveratrol* v listové části

Jednorozměrné testy významnosti pro Výtěžnost (Tabulka1) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy					
Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	4687,225	1	4687,225	10747,78	0,00
Typ extrakce	242,075	3	80,692	185,03	0,00
Chyba	15,700	36	0,436		

Tabulka č. 15: Výstup z programu Statistica – Scheffého test, *trans-resveratrol* v listové části

Scheffeho test; proměnná Výtěžnost (Tabulka1) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,43611, sv = 36,000					
Č. buňky	Typ extrakce	{1} 8,3000	{2} 9,4000	{3} 10,800	{4} 14,800
1	Methanol		0,007766	0,000000	0,000000
2	Acetonitril-voda	0,007766		0,000509	0,000000
3	Methanol-voda	0,000000	0,000509		0,000000
4	NO2	0,000000	0,000000	0,000000	

Z výše vložených tabulek, můžeme říci, že existuje statisticky významný rozdíl mezi všemi jednotlivými typy extrakce v listové části Křídlatky japonské.

5.1.1.3 Výtěžky *trans-resveratrolu* v stonkové části

Tabulka č. 16: Výstup z programu Statistica – Anova, *trans-resveratrol* ve stonkové části

Jednorozměrné testy významnosti pro Výtěžnost (Tabulka42) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy					
Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	637562,5	1	637562,5	17800,72	0,000000
Typ extrakce	3034,1	3	1011,4	28,24	0,000000
Chyba	1289,4	36	35,8		

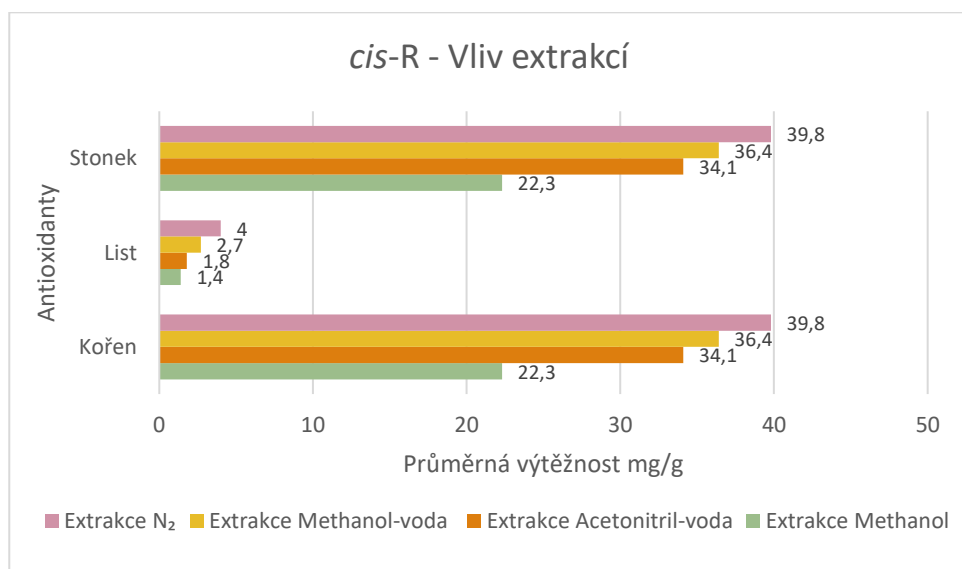
Tabulka č. 17: Výstup z programu Statistica – Scheffého test, *trans-resveratrol* ve stonkové části

Scheffeho test; proměnná Výtěžnost (Tabulka42) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 35,817, sv = 36,000					
Č. buňky	Typ extrakce	{1} 114,40	{2} 124,70	{3} 127,00	{4} 138,90
1	Methanol		0,005665	0,000558	0,000000
2	Acetonitril-voda	0,005665		0,863513	0,000102
3	Methanol-voda	0,000558	0,863513		0,001153
4	NO2	0,000000	0,000102	0,001153	

Po statistickém vyhodnocení Anova s následným Scheffého testem z výsledků vyplývá, že existuje statisticky významný rozdíl v použití různé metody extrakce, kromě vztahu extrakce směsi acetonitrilu a vody s extrakcí směsi methanolu a vody, kdy není potvrzen statisticky významný rozdíl.

5.1.2 Porovnání výtěžnosti *cis*-resveratrolu dle typu extrakce

Při analýze *cis*-resveratrolu byla opět nejúčinnější metoda extrakce pomocí tekutého dusíku s výslednou průměrnou výtěžností 83,6 mg/g rostliny. Oproti tomu nejméně účinnou formou extrakce bylo využití čistého methanolu, kdy byla výsledná souhrnná průměrná výtěžnost 46 mg/g rostliny. Tento rozdíl představuje o 45 % menší celkovou výtěžnost z testované rostliny. O 10 % menší výtěžnost oproti použití N₂ vykazuje extrakce směsí methanolu a vody s výsledným průměrným ziskem 75,5 mg/g rostliny. V porovnání s nejnižší účinností extrakce pomocí acetonitrilu v případě *trans*-resveratrolu, je jeho účinnost u *cis*-resveratrolu mnohem větší a oproti nejúčinnější metodě je jeho zisk menší o 16 % celkového průměrného *cis*-resveratrolu.



Graf č. 5: Porovnání účinnosti jednotlivých metod v extrakci *cis*-resveratrolu

5.1.2.1 Výtěžky *cis*-resveratrolu v kořenové části

Tabulka č. 18: Výstup z programu Statistica – Anova, *cis*-resveratrol v kořenové části

Jednorozměrné testy významnosti pro Výtěžek <i>cis</i> -Resveratrolu (Tabulka16) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy					
Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	13616,10	1	13616,10	1875,209	0,00
Typ Extrakce	3534,50	3	1178,17	162,257	0,00
Chyba	261,40	36	7,26		

Tabulka č. 19: Výstup z programu Statistica – Scheffého test, *cis*-resveratrol v kořenové části

		Scheffeho test; proměnná Výtěžek <i>cis</i> -Resveratrolu (Tabulka16) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 7,2611, sv = 36,000			
Č. buňky	Typ Extrakce	{1} 13,500	{2} 10,300	{3} 15,600	{4} 34,400
1	Methanol		0,088623	0,398588	0,000000
2	Acetonitril-voda	0,088623		0,001315	0,000000
3	Methanol-voda	0,398588	0,001315		0,000000
4	NO2	0,000000	0,000000	0,000000	

Z tabulky č. 18 lze usoudit, že rozdíl mezi extrakcemi je statisticky významný, pro bližší vyhodnocení jsem provedla Scheffého test, viz tabulka č. 19, kde můžeme pozorovat statisticky významný rozdíl mezi extrakcí pomocí tekutého dusíku a všemi zbylými extrakcemi. Dále vidíme statisticky významný rozdíl mezi 2. a 3. typem extrakce. U ostatních kombinací typů extrakcí není statisticky významný rozdíl.

5.1.2.2 Výtěžky *cis*-resveratrolu v listové části

Tabulka č. 20: Výstup z programu Statistica – Anova, *cis*-resveratrol v listové části

		Jednorozměrné testy významnosti pro Výtěžek <i>cis</i> -Resveratrolu (Tabulka16) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy			
Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	245,0250	1	245,0250	1089,000	0,000000
Typ Extrakce	39,8750	3	13,2917	59,074	0,000000
Chyba	8,1000	36	0,2250		

Tabulka č. 21: Výstup z programu Statistica – Scheffého test, *cis*-resveratrol v listové části

		Scheffeho test; proměnná Výtěžek <i>cis</i> -Resveratrolu (Tabulka16) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,22500, sv = 36,000			
Č. buňky	Typ Extrakce	{1} 1,4000	{2} 1,8000	{3} 2,7000	{4} 4,0000
1	Methanol		0,329035	0,000009	0,000000
2	Acetonitril-voda	0,329035		0,002005	0,000000
3	Methanol-voda	0,000009	0,002005		0,000009
4	NO2	0,000000	0,000000	0,000009	

Podle výsledků získaných z testu Anova lze říci, že výtěžnost *cis*-resveratrolu u jednotlivých typů extrakcí je statisticky významná. Pouze mezi extrakcí směsí acetonitrilu a vody s extrakcí methanolem není statisticky významný rozdíl.

5.1.2.3 Výtěžky *cis*-resveratrolu ve stonkové části

Tabulka č. 22: Výstup z programu Statistica – Anova, *cis*-resveratrol ve stonkové části

Jednorozměrné testy významnosti pro Výtěžek <i>cis</i> -Resveratrolu (Tabulka16) Sigma-omezená parametrizace Dekompozice efektivní hypotézy					
Efekt	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Abs. člen	43956,90	1	43956,90	3813,129	0,000000
Typ Extrakce	1734,10	3	578,03	50,143	0,000000
Chyba	415,00	36	11,53		

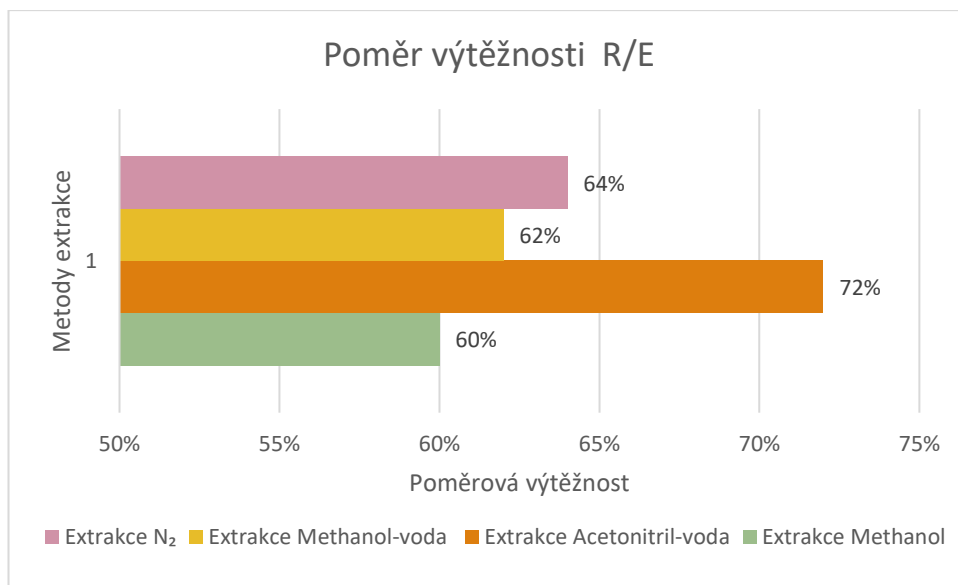
Tabulka č.23: Výstup z programu Statistica – Scheffého test, *cis*-resveratrol ve stonkové části

Scheffeho test; proměnná Výtěžek <i>cis</i> -Resveratrolu (Tabulka16) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 11,528, sv = 36,000					
Č. buňky	Typ Extrakce	{1} 22,300	{2} 34,100	{3} 36,400	{4} 39,800
1	Methanol		0,000000	0,000000	0,000000
2	Acetonitril-voda	0,000000		0,521257	0,007210
3	Methanol-voda	0,000000	0,521257		0,190406
4	NO2	0,000000	0,007210	0,190406	

Z výsledků Anovy lze říci, že existuje statisticky významný rozdíl ve výtěžnosti *cis*-resveratrolu ve stonkové části rostliny u všech extrakcí kromě extrakce č. 2. a 3. a 4., kdy rozdíl není statisticky významný.

5.1.3 Poměr výtěžnosti Resveratrolu ku Emodinu

Protože je pro nás ze zdravotního hlediska důležité kontrolovat i přítomnost emodinu v doplňcích stravy a farmaceutikách, zajímal nás tak vztah mezi množstvím extrahovaného emodinu ku množství získaného resveratrolu. Z následujícího grafu zjistíme, že při použití extrakce pomocí methanolu či směsi methanolu a vody získáme průměrně 0,6 a 0,62 mg emodinu a emodin-glukosidu na gram celkového resveratrolu. Z tohoto pohledu patří k nejméně vhodným způsobům extrakce pomocí směsi acetonitrilu a vody, kdy na každý 1 g celkového resveratrolu získáme 0,72 mg emodinu a emodin-glukosidu.



Graf č. 6: Poměrová extrakce emodinu a emodin-glukosidu ku získanému celkovému resveratrolu.

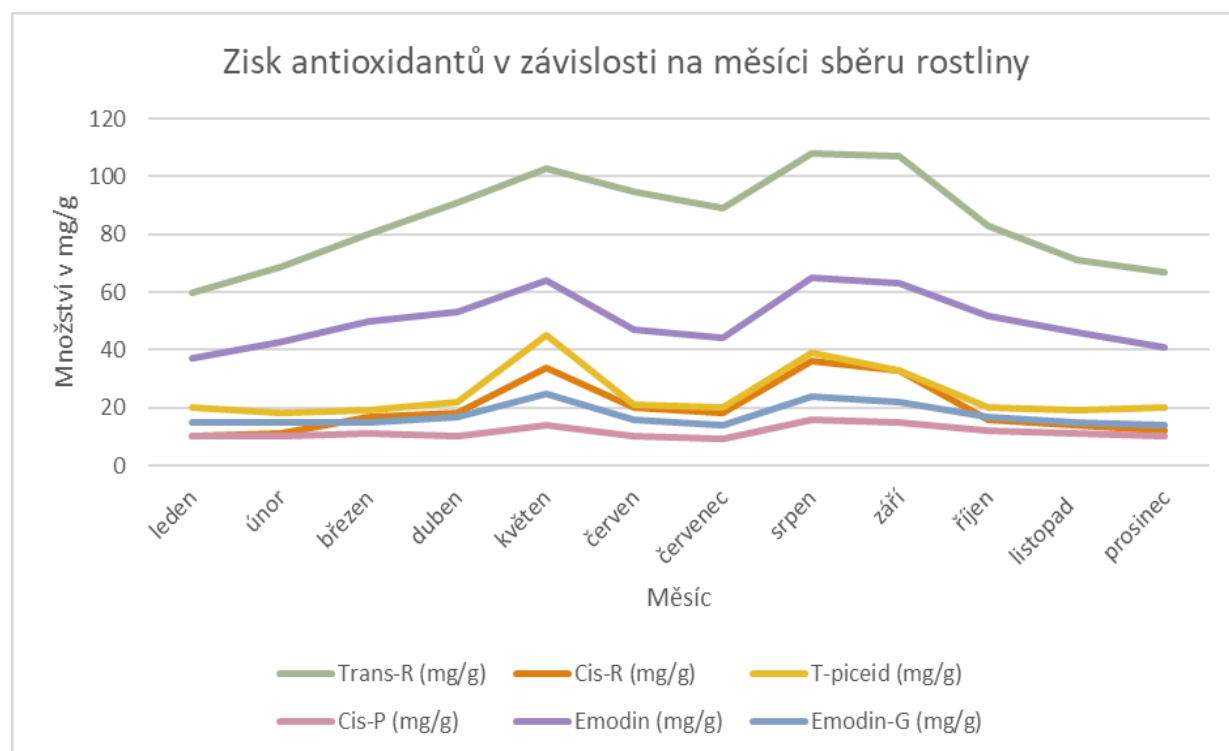
5.2 Výnos resveratrolu a dalších látek v závislosti na čase sběru rostlin

Zajímalo nás, jestli se liší zisk jednotlivých antioxidantů v závislosti na ročním období, příjmu slunečních paprsků, výši teploty a dalších vlivů, které jsou proměnné v čase. Zaznamenané hodnoty jsou v tabulce níže, z kterých vyplývá jasná korelace mezi jednotlivými měsíci a získaným množstvím jednotlivých antioxidantů.

Tabulka č. 24: Vliv měsíce sběru rostliny na celkové množství detekovaných antioxidantů

Měsíc	Trans-R (mg/g)	Cis-R (mg/g)	T-piceid (mg/g)	Cis-P (mg/g)	Emodin (mg/g)	Emodin-G (mg/g)
leden	60	10	20	10	37	15
únor	69	11	18	10	43	15
březen	80	17	19	11	50	15
duben	91	18	22	10	53	17
květen	103	34	45	14	64	25
červen	95	20	21	10	47	16
červenec	89	18	20	9	44	14
srpen	108	36	39	16	65	24
září	107	33	33	15	63	22
říjen	83	16	20	12	52	17
listopad	71	14	19	11	46	15
prosinec	67	12	20	10	41	14

Tyto rozdíly jsou lépe viditelné na níže přiloženém grafu č. 7, který nám graficky znázorňuje korelaci času sběru s množstvím detekovaných antioxidantů. Nejvíce látek s antioxidační aktivitou lze získat sběrem rostliny v měsíci květnu, srpnu a září, kdy se naměřené hodnoty, například trans-resveratrolu, pohybují v rozmezí 103–108 mg/kg. Naopak k měsícům s nejnižší detekcí zisku patří měsíce zimní, tedy prosinec, leden a únor s výtěžností pohybující se v rozpětí 60–67 mg/g rostliny. Zprůměrujeme-li tedy 3 nejziskovější a 3 nejméně ziskové měsíce, zjistíme, že rozdíl výtěžnosti je o 62 % vyšší v měsících květnu, srpnu a září.



Graf č. 7: Přehled výtěžku jednotlivých látek v závislosti na měsíci sběru

6 Diskuze

Tato práce je zaměřena na vývoj metodiky pro vyšší výtěžnosti antioxidantů z rostlinných matric. Antioxidanty jsou zkoumány pro své pozitivní účinky na organismus, a proto patří resveratrol k jedním z nejvíce zkoumaných látek z řady polyfenolů. Mezi benefitní účinky se řadí například chemoprotektivní a vazodilatační účinky, také mají pozitivní vliv na kardiovaskulární onemocnění, diabetes mellitus a další. Z tohoto důvodu je důležité nalézt takovou metodu, kdy bude výtěžnost resveratrolu a látek s podobným účinkem z rostlinných materiálů co nejvyšší.

Hlavním cílem práce bylo zjistit, jaký bude rozdíl ve výtěžnosti jednotlivých metod extrakce a zda lze z rostlinných matric získat strukturně podobné látky s obdobným účinkem jako je resveratrol. Také jsme chtěli porovnat vliv sběru rostlin v jednotlivých měsících na výtěžnost resveratrolu z rostlinné matrice.

Z naměřených výsledků vyplývá, že největší koncentrace všech účinných látek se nachází ve stonku rostliny, poté následuje kořen. Listy obsahují v porovnání s předchozími částmi pouze zanedbatelné množství. Pro extrakci resveratrolu je nejvhodnější částí stonek, pravděpodobně z důvodu nejvyššího vystavení slunečnímu záření, tedy i stresu. Avšak s tímto tvrzením je v rozporu studie provedená týmem Kurita et al. (2014), kde bylo detekováno pouze malé množství volného resveratrolu v nadzemní části rostliny Křídlatky japonské. Příčinou tohoto rozdílu jsou pravděpodobně jiné podmínky růstu, podnebí, množství slunečního svitu a další podobné vlivy. Jak již bylo zmíněno výše v této práci, tak resveratrol vzniká biosyntézou na základě stresu rostliny z vnějších vlivů. Dalším důvodem, proč je obsah bioaktivních látek nejvyšší ve stonku je, že polyfenolické látky mají tendenci shlukovat se v kůře stonku, kvůli případnému napadení rostliny škůdci. Tento jev by mohl být výhodou u rostlin, kde jsou její plody použity ke konzumaci či výrobě nápojů. Toto však nelze uplatnit plošně, například kořeny lékořice (*Glycyrrhiza*) obsahují vysoké množství polyfenolů (Brglez Mojzer et al. 2016). Další rostlinou, kde můžeme nalézt vysoký obsah resveratrolu je réva vinná, kde se nejvíce této látky nachází právě v listech a bobulích (Souid et al. 2019).

Z tabulky č. 11 lze vyčíst, že existuje rozdíl mezi jednotlivými typy extrakce. Nejúčinnější metoda využívá tekutý dusík. Jedná se o metodu námi navrženou a validovanou. Extrakce všech námi stanovovaných látek v kořenové části pomocí N_2 je až o 31–46 % účinnější než zbylé extrakce. Co se týče listové části, tak je extrakce tekutým dusíkem účinnější o 30–42 %. Nejmenší rozdíly ve výši extrakce jsou ve stonku, kdy se rozdíl pohybuje mezi 8–26 %, avšak stále se jedná o metodu s nejvyšší výtěžností námi stanovovaných bioaktivních látek. Nejvyšší výtěžnost touto metodou je pravděpodobně dána minimální ztrátou účinných látek během extrakce. Při přípravě zbylých extrakcí byla ztráta rostlinného materiálu, tedy bioaktivních látek větší.

Výtěžnost samotného *trans*-resveratrolu se v jednotlivých částech lišila následovně. V kořenové části byla extrakce pomocí N_2 účinnější o 25 % oproti extrakci

methanolem, o 63 % v případě extrakce směsí acetonitrilu a vody a o 19 % v případě extrakce směsí methanolu a vody. V listové části byly zaznamenány největší rozdíly, extrakce pomocí tekutého dusíku byla o 44 % účinnější než extrakce methanolem, o 36 % účinnější než extrakce směsí acetonitrilu a vody a o 27 % v případě použití extrakce směsí methanolu a vody. Ve stonkové části byla extrakce tekutým dusíkem účinnější o 18 % v případě extrakce methanolem, o 10 % při použití extrakce směsí acetonitrilu a vody a co se týče použití extrakce směsí methanolu a vody byla extrakce pomocí N₂ účinnější o 9 %. Z tohoto vyplývá, že nejmenší rozdíl výtěžnosti jednotlivých metod extrakce byl právě ve stonku.

Zjistili jsme, že resveratrol se vyskytuje v rostlinách ve dvou izomerech, přičemž izomer *trans*- je zastoupen hojněji. Při extrakci naší metodou je ho až 3,7krát více vůči *cis*- a to v případě extrakce z listu. Tento jev je dán větší stabilitou *trans*-resveratrolu, protože ke vzniku *cis*-resveratrolu je důležitá přítomnost UV záření (Souid et al. 2019). Stejně tak tomu je i u strukturně podobné sloučeniny – piceidu, kdy jeho výskyt a výtěžnost v izomeru *cis*- je menší až o 65 % než u izomeru *trans*-piceidu. Na výsledné množství získaného piceidu má vliv mnoho vnějších vlivů (napadení škůdcem, sucho, zasolení a další), které vyvolají katalýzu resveratrolu pomocí glykosyltransferázy (Souid et al. 2019). Výtěžnost *trans*-resveratrolu v jednotlivých částech byla vždy nejvyšší v poměru s ostatními látkami. Srovnáme-li výtěžek *trans*-resveratrolu s výtěžkem *trans*-piceidu ve všech metodách a částech rostlin, tak je výtěžek *trans*-piceidu menší průměrně o 69 %. Protože je piceid glykosidová forma resveratrolu, tak může být finální množství po extrakci nižší z důvodu potřeby jiné extrakční metody a dalších fyzikálně-chemických vlastností.

Důležité je také kontrolovat množství vyextrahovaného emodinu a emodin glukosidu z důvodu negativních dopadů na lidský organismus. Ve studii vedené Fatima et al. (2023) byly stanoveny limity pro maximální denní příjem u člověka. Hodnoty, které byly stanovené pro emodin jsou ve výši 0,166 mg/kg a pro emodin-glukosid jsou ve výši 0,331 mg/kg člověka, tato studie se také zabývala extrakcí účinných látek z Křídlatky japonské. Přestože existují důkazy o farmakologických účincích emodinu, tak mnohé studie naznačují několik nežádoucích účinků, například studie Chen et al. (2020) odhalila hepatotoxické, nefrotické a genotoxické účinky emodinu na lidský organismus. Tento toxický vliv byl objeven také ve studii od Li et al. (2019), kde zkoumali Rdesno mnohokvěté. Přestože má emodin hepatoprotektivní účinky, studie dle Li et al. (2012); Zheng et al. (2019) poukázaly na cytotoxický efekt na lidské jaterní buňky, který může vést k apoptóze a následnému poškození jater.

Na grafu č. 6 můžeme vidět, že množství vyextrahovaného emodinu a emodin-glukosidu v poměru ku celkovému výtěžku u obou izomerů resveratrolu je kolem 60-64 % až na extrakci pomocí směsi acetonitrilu a vody, kdy je tento poměr 72 %. Z důvodu následného odstranění těchto sloučenin je tedy lepší mít tento poměr co nejnižší. Ve studii provedené týmem Fatima et al. (2023) byl základě Lipinského pravidla pěti emodin-glukosid odstraněn při primárním screeningu. Toto pravidlo vyhodnocuje fyziologicko-chemické a farmakokinetické vlastnosti, které určují osud sloučeniny jako léčiva či látky bez léčebných účinků.

Poslední částí této práce bylo odhalení vlivu výnosu resveratrolu v závislosti na čase sběru rostliny v jednotlivých měsících. Z grafu č. 7 je velmi dobře viditelné, že výnosy byly nejvyšší v měsíci květnu, srpnu a září. Naopak v zimních měsících (prosinec, leden, únor) patří výtěžnost k nejmenším. Tento jev je dán biosyntézou resveratrolu závislou na slunečním záření, druhu rostliny, podnebí a dalšími vlivy. Ve studii zaměřené na obsah resveratrolu v Křídlatce japonské vzhledem k ročním obdobím bylo zjištěno, že jednotlivé části rostlin, podzemní a nadzemní, se lišily. Podzemní části dosahují vrcholu na jaře a nadzemní části měly nejvyšší obsah resveratrolu na podzim. V letních a zimních měsících je tedy obsah nejnižší. V létě působí řada stresujících faktorů jako intenzivní sluneční záření či vysoké teploty, které vedou k rychlé spotřebě uskladněného resveratrolu (Kurita et al. 2014). Lze předpokládat, že tento jev bude společný pro více rostlin.

7 Závěr

Cílem této práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat metodu HPLC-MS ke stanovení resveratrolu a dalších antioxidantů (piceid, emodin a emodin-glukosid) z rostlinných matric spolu s optimalizací přípravy vzorků. Pro přípravu vzorků z rostlinných matric byly použity čtyři typy extrakce, kde první spočívala ve využití extraktantu 100 % methanolu, druhá využívala směsi methanolu a vody (50:50), třetí byla v podobě směsi acetonitrilu a vody v poměru 50:50. Poslední typ extrakce, námi navržený, využíval tekutý dusík jako extraktant. Podmínkou byla využitelnost metody v kvantitativní a kvalitativní analýze resveratrolu a dalších polyfenolických látek. Metoda byla validována, byla nalezena hodnota meze detekce i kvantifikace jednotlivých stanovovaných sloučenin. Tato metoda byla testována na třech částech rostliny Křídlatky japonské (kořen, list, stonek), jejíž vzorky byly poskytnuty firmou InterPharma Praha, a.s.. Jednotlivé typy extrakce byly porovnány a bylo zjištěno, že metoda extrakce tekutým dusíkem patřila ke statisticky nejúčinnějším. Celkově nejvyšší výtěžnost byla nalezena ve stonku, poté následoval kořen. List patřil k nejméně výtěžným částem rostliny, kdy hodnoty byly v poměru s ostatními prakticky zanedbatelné.

Dalším cílem bylo zjistit, zda se obsah polyfenolických látek v rostlině mění v závislosti na času sběru, přičemž jsme porovnávaly jednotlivé měsíce. Z naměřených hodnot bylo jasné, že existuje vztah mezi množstvím resveratrolu a dalších bioaktivních látek ve vztahu k času sběru rostlin. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo v měsících květnu, srpnu a září. Naopak v zimních měsících byly výtěžky nejmenší.

- Hypotéza: V rostlinných matricích obsahujících resveratrol je řada strukturně podobných látek, které mohou rovněž fungovat jako zhášeče volných radikálů (ROS) (tj. komplex působících látek), byla tedy potvrzena. Také bylo zjištěno, že některé sloučeniny (emodin, emodin-glukosid) mohou mít nejen pozitivní účinky, ale v nesprávné dávce mohou působit genotoxicky.

Vzhledem ke stále nabývající popularitě rostlinných farmakologicky účinných látek, lze předpokládat vznik nových studií na toto téma, které budou prohlubovat informace o jejich účinku, dávce a toxicitě. Z těchto důvodů by bylo vhodné dedikovat této problematice další výzkumy.

8 Literatura

Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. 2004. Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Research* [online]. 2004(24), 5 [cit. 2022-11-08]. PMID: 15517885. Dostupné z: <https://ar.iiarjournals.org/content/24/5A/2783.short>

Ahmed T, Javed Se, Javed Sa, Tariq A, Šamec D, Tejada S, Nabavi SF, Braidly N, Nabavi SM. 2017. Resveratrol and Alzheimer's Disease: Mechanistic Insights. *Molecular Neurobiology* [online]. 54(4), 2622-2635 [cit. 2023-02-15]. ISSN 0893-7648. Dostupné z: doi:10.1007/s12035-016-9839-9

Andreescu S, Hepel M. 2011. *Oxidative Stress: : Diagnostics, Prevention, and Therapy* [online]. New York: American Chemical Society, 1083 s. [cit. 2023-02-16]. ISBN 9780841226845. Dostupné z: doi:10.1021/bk-2011-1083

Aquilina G, et al.. 2022. Technical Report on the request for technical assistance in relation to the safety of hydroxyanthracene derivatives. *EFSA Supporting Publications* [online]. 19(10) [cit. 2022-11-27]. ISSN 23978325. Dostupné z: doi:10.2903/sp.efsa.2022.EN-7636

Benzie I, Wachtel-Galor S. 2011. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. Second Edition. USA: CRC Press. ISBN 9781439807132.

Bononi I, Tedeschi P, Mantovani V, Maietti A, Mazzoni E, Pancaldi C, Brandollini V, Tognon M. 2022. Antioxidant Activity of Resveratrol Diastereomeric Forms Assayed in Fluorescent-Engineered Human Keratinocytes. *Antioxidants* [online]. 11(2) [cit. 2023-02-10]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox11020196

Boots A, Haenen G, Bast A. 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology* [online]. 585(2-3), 325-337. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.008

Brglez Mojzer E, Knez Hrnčič M, Škerget M, Knez Ž, Urban B. 2016. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* [online]. 21(7) [cit. 2023-03-06]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules21070901

Caballero B, Finglas P, Toldrá F. 2016. *Encyclopedia of food and health*. Boston: Academic Press is an imprint of Elsevier. ISBN 978-0-12-384947-2.

Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer N. 2012. Resveratrol: French Paradox Revisited. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 3 [cit. 2023-01-14]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2012.00141

Creasy GL, Creasy LL. 2018. *Grapes*. CABI, Boston.

Cucu A, Baci GB, Dezsai S, Nap ME, Beteg FI, Bonta V, Bobis O, Caprio E, Dezmiorean DS. 2021. New Approaches on Japanese Knotweed (*Fallopia japonica*) Bioactive Compounds and Their Potential of Pharmacological and Beekeeping Activities: Challenges and Future Directions.

Plants [online]. 10(12) [cit. 2022-11-17]. ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants10122621

Delmas D, Jannin B, Latruffe N. 2005. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing [online]. 49(5), 377-395 [cit. 2022-11-23]. ISSN 1613-4125. Dostupné z: doi:10.1002/mnfr.200400098

Di Lorenzo CH, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. 2021. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients* [online]. 13(1) [cit. 2022-10-27]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu13010273

Dolinsky V, Dyck J. 2011. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 1812(11), 1477-1489 [cit. 2023-03-1]. ISSN 09254439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2011.06.010

Dong X, Fu J, Yin X, Cao S, Li X, Lin L, Ni J. 2016. Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics. *Phytotherapy Research* [online]. 30(8), 1207-1218 [cit. 2023-02-17]. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.5631

EFSA: Compendium of botanicals that have been reported to contain toxic, addictive, psychotropic or other substances of concern, 2009. EFSA Supporting Publications [online]. 6(6), 17-80 [cit. 2022-09-27]. ISSN 23978325. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2009.281

Embuscado ME. 2015. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. *Journal of Functional Foods* [online]. 18, 811-819 [cit. 2022-11-18]. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2015.03.005

Fatima M, et al. 2023. Quorum Quenchers from *Reynoutria japonica* in the Battle against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Molecules* [online]. 28(6) [cit. 2023-04-08]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28062635

Frum A. 2015. Resveratrol extraction and analysis methods from different plant parts. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* [online]. 21(1), 95-101 [cit. 2022-10-17]. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Resveratrol-extraction-and-analysis-methods-from-Frum/24069fea95dafa10b513401fbaaea493ef34aa88#citing-papers>

Gavezzotti P, Bertacchi F, Fronza G, Křen V, Monti D, Riva S. 2015. Laccase-Catalyzed Dimerization of Piceid, a Resveratrol Glucoside, and its Further Enzymatic Elaboration [online]. 357(8), 1831-1839 [cit. 2023-02-01]. ISSN 16154150. Dostupné z: doi:10.1002/adsc.201500185

Giovinazzo G, Carluccio MA, Grieco F. 2018. Wine Polyphenols and Health. In: MERILLON, Jean-Michel a Kishan Gopal RAMAWAT, ed. *Sweeteners* [online]. Cham: Springer International Publishing, s. 1-21 [cit. 2020-07-12]. Reference Series in Phytochemistry. ISBN 978-3-319-26478-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-54528-8_81-1

Haseeb S, Alexander B, Baranchuk A. 2017. Wine and Cardiovascular Health. *Circulation* [online]. 136(15), 1434-1448. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030387

HPLC Standard Systems, 2006-2023. In: Thermofisher Scientific [online]. [cit. 2023-03-03]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAAAGABHFAPBMBFC>

Huang X, Mazza G. 2011. Simultaneous analysis of serotonin, melatonin, piceid and resveratrol in fruits using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. s. 3890-3899 [cit. 2023-01-26]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2011.04.049

Chang SK, Alasalvar C, Shahidi F. 2016. Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. *Journal of Functional Foods* [online]. 21, 113-132 [cit. 2022-10-28]. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2015.11.034

Cheng Ch, Luo JY, Lau Ch, Chen ZY, Tian X, Huang Y. 2020. Pharmacological basis and new insights of resveratrol action in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*. 177(6), 1258-1277. ISSN 0007-1188. Dostupné z: doi:10.1111/bph.14801

Chen Y, et al. 2020. Metabolism and Toxicity of Emodin: Genome-Wide Association Studies Reveal Hepatocyte Nuclear Factor 4 α Regulates UGT2B7 and Emodin Glucuronidation. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 33(7), 1798-1808 [cit. 2023-04-02]. ISSN 0893-228X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrestox.0c00047

iNaturalist. 2011. iNaturalist Křídlatka Japonská (*Reynoutria japonica*). USA. [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: <https://www.inaturalist.org/photos/7065992>

Islam R, et al.. 2015. Toxicity of Anthraquinones: Differential Effects of Rumex Seed Extracts on Rat Organ Weights and Biochemical and Haematological Parameters. *Phytotherapy Research* [online]. 29(5), 777-784 [cit. 2022-10-17]. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.5317

Jeandet P, Bessis R, Gautheron B. 1991. The Production of Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by Grape Berries in Different Developmental Stages. *American Journal of Enology and Viticulture* [online]. 42(1), 41-46 [cit. 2022-12-06]. ISSN 0002-9254. Dostupné z: doi:10.5344/ajev.1991.42.1.41

Krasowski M, Blau J. 2010. Drug Interactions with St. John's Wort. *Herbal Supplements* [online]. Hoboken, NJ, USA, 273-290 [cit. 2023-03-26]. ISBN 9780470910108. Dostupné z: doi:10.1002/9780470910108.ch12

Kurita S, Kashiwagi T, Ebisu T, Shimamura T, Ukeda H. 2014. Content of resveratrol and glycoside and its contribution to the antioxidative capacity of *Polygonum cuspidatum* (Itadori) harvested in Kochi. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 78(3), 499-502 [cit. 2023-04-02]. ISSN 0916-8451. Dostupné z: doi:10.1080/09168451.2014.890032

Kuršvietienė L, Stanevičienė I, Mongirdienė A, Bernatoniene J. 2016. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina* [online]. 52(3), 148-155. ISSN 1010660X. Dostupné z: doi:10.1016/j.medic.2016.03.003

Lam Y, Peterson C, Ravussin E. 2013. Resveratrol vs. calorie restriction: Data from rodents to humans. *Experimental Gerontology* [online]. 48(10), 1018-1024 [cit. 2023-03-01]. ISSN 05315565. Dostupné z: doi:10.1016/j.exger.2013.04.005

Leischner CH, Burkard M, Pfeiffer M, Lauer U, Busch CH, Venturelli S. 2015. Nutritional immunology: function of natural killer cells and their modulation by resveratrol for cancer prevention and treatment. *Nutrition Journal* [online]. 15(1) [cit. 2022-09-27]. ISSN 1475-2891. Dostupné z: doi:10.1186/s12937-016-0167-8

Li Ch, et al. 2019. HLA-B*35: 01 Allele Is a Potential Biomarker for Predicting Polygonum multiflorum-Induced Liver Injury in Humans. *Hepatology* [online]. 70(1), 346-357 [cit. 2023-04-02]. ISSN 0270-9139. Dostupné z: doi:10.1002/hep.30660

Li CL, et al. 2012. Determination of emodin in L-02 cells and cell culture media with liquid chromatography-mass spectrometry: Application to a cellular toxicokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 71, 71-78 [cit. 2023-04-02]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2012.07.031

Luo T, Li N, He YQ, Weng SQ, Wang T, Zou QX, Zeng XH. 2015. Emodin inhibits human sperm functions by reducing sperm [Ca²⁺]_i and tyrosine phosphorylation. *Reproductive Toxicology* [online]. 51, 14-21 [cit. 2022-10-17]. ISSN 08906238. Dostupné z: doi:10.1016/j.reprotox.2014.11.007

Mass spectrometers: 3200 QTrap, 2023. In: Sciex [online]. [cit. 2023-03-03]. Dostupné z: <https://sciex.com/br/products/mass-spectrometers/qtrap-systems/qtrap-3200-system>

Menichini G, Alfano C, M Marrelli, Toniolo C, Provenzano E, Statti GA, Nicoletti M, Menichini F, Conforti F. 2013. *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum* induces inhibition of free radicals and enhanced phototoxicity in human melanoma cells under ultraviolet light. *Cell Proliferation* [online]. 46(2), 193-202 [cit. 2023-03-26]. ISSN 0960-7722. Dostupné z: doi:10.1111/cpr.12020

Moldoveanu S, David V. 2016. Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis. Netherlands: Elsevier. ISBN 9780128036846.

Naiker M, Anderson S, Johnson JB, Mani JS, Wakeling L, Bowry V. 2020. Loss of trans-resveratrol during storage and ageing of red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* [online]. 26(4), 385-387 [cit. 2022-10-12]. ISSN 1322-7130. Dostupné z: doi:10.1111/ajgw.12449

Obchod a marketing: Doplnky stravy, 2019. In: Interpharma-praha. Dostupné z: <https://www.interpharma-praha.com/obchod-a-marketing#article97> Accessed 12.03.2023.

- Oshida K, Hirakata M, Maeda A, Miyoshi T, Miyamoto Y. 2011. Toxicological effect of emodin in mouse testicular gene expression profile. *Journal of Applied Toxicology* [online]. 31(8), 790-800 [cit. 2023-02-17]. ISSN 0260437X. Dostupné z: doi:10.1002/jat.1637
- Peng W, Qin R, Li X, Zhou H. 2013. Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb.et Zucc: A review. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 148(3), 729-745 [cit. 2022-11-27]. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2013.05.007
- Phaniendra A, Jestadi D, Periyasamy L. 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* [online]. 30(1), 11-26 [cit. 2023-02-15]. ISSN 0970-1915. Dostupné z: doi:10.1007/s12291-014-0446-0
- Polyphenol: 592, 2005. In: *Phenol-Explorer* [online]. [cit. 2023-02-15]. Dostupné z: <http://phenol-explorer.eu/contents/polyphenol/592> Accessed 08.11.2022.
- National Center for Biotechnology Information. 2022a. PubChem Compound Summary for CID 99649, Emodin-8-glucoside. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Emodin-8-glucoside>. Accessed 18.10.2022.
- National Center for Biotechnology Information. 2022b. PubChem Compound Summary for CID 445154, Resveratrol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resveratrol>. Accessed 12.10.2022.
- Sawda Ch, Moussa Ch, Turner R. 2017. Resveratrol for Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 1403(1), 142-149 [cit. 2023-01-14]. ISSN 00778923. Dostupné z: doi:10.1111/nyas.13431
- Singh A, Singh R, Verma S, Rai V, Kaschula V, Maiti P, Gupta S. 2019. Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies. *Medicinal Research Reviews* [online]. 39(5), 1851-1891. ISSN 01986325. Dostupné z: doi:10.1002/med.21565
- Souid I, Toumi I, Hermosín-Gutiérrez I, Nasri S, Mliki A, Ghorbel A. 2019. The effect of salt stress on resveratrol and piceid accumulation in two *Vitis vinifera* L. cultivars. *Physiology and Molecular Biology of Plants* [online]. 25(3), 625-635 [cit. 2023-03-07]. ISSN 0971-5894. Dostupné z: doi:10.1007/s12298-019-00668-2
- Státní zemědělská a potravinářská inspekce: Právní předpisy vztahující se k doplňkům stravy a obecné informace o doplňcích stravy, 2019. In: Státní zemědělská a potravinářská inspekce [online]. [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: <https://www.szpi.gov.cz/clanek/pravni-predpisy-vztahujici-se-k-doplncum-stravy-a-obecne-informace-o-doplncich-stravy.aspx?q=Y2hudW09Mg%3D%3D>
- Stefanowicz AM, Stanek M, Nobis M, Zubek S. 2017. Few effects of invasive plants *Reynoutria japonica*, *Rudbeckia laciniata* and *Solidago gigantea* on soil physical and chemical properties. *Science of The Total Environment* [online]. 574, 938-946 [cit. 2022-09-27]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2016.09.120

Su D, Cheng Y, Liu M, Liu D, Cui H, Zhang B, Zhou S, Yang T, Mei Q. 2013. Comparison of Piceid and Resveratrol in Antioxidation and Antiproliferation Activities In Vitro. PLoS ONE [online]. 8(1) [cit. 2023-02-27]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0054505

The Editors of Encyclopaedia Britannica. 2020. Encyclopaedia Britannica. Britannica Group. Available from <https://www.britannica.com/plant/grape> Accessed February 2023).

The Editors of Encyclopaedia Britannica. 2020. Encyclopaedia Britannica. Britannica Group. Available from <https://www.britannica.com/plant/Hypericum#ref280639> Accessed February 2023).

Tian B, Liu J. 2020. Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. Journal of the Science of Food and Agriculture [online]. 100(4), 1392-1404. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.10152

Wang H, Liu L, Guo YX, Dong YS, Zhang DJ, Xiu ZL. 2007a. Biotransformation of piceid in *Polygonum cuspidatum* to resveratrol by *Aspergillus oryzae*. Applied Microbiology and Biotechnology [online]. 75(4), 763-768 [cit. 2023-01-12]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-007-0874-3

Wang CH, Zhang D, Ma H, Liu J. 2007b. Neuroprotective effects of emodin-8-O- β -d-glucoside in vivo and in vitro. European Journal of Pharmacology [online]. 577(1-3), 58-63 [cit. 2023-01-15]. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2007.08.033

Williamson G., 2017. The role of polyphenols in modern nutrition. Nutrition Bulletin [online]. 42(3), 226-235 [cit. 2022-10-12]. ISSN 14719827. Dostupné z: doi:10.1111/nbu.12278

Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB. 2010. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. International Journal of Molecular Sciences [online]. 11(2), 622-646 [cit. 2020-07-11]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms11020622

Younes M, et al.. 2018. EFSA Journal [online]. 16(1) [cit. 2023-03-27]. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2018.5090

Zákony pro lidi: Zákon č. 378/2007 Sb., zákon o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů, 2010-2023. In: Zákony pro lidi [online]. [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-378>

Zheng XY, Yang SM, Zhang R, Wang SM, Li GB, Zhou S. 2019. Emodin-induced autophagy against cell apoptosis through the PI3K/AKT/mTOR pathway in human hepatocytes. Drug Design, Development and Therapy [online]. 13, 3171-3180 [cit. 2023-04-02]. ISSN 1177-8881. Dostupné z: doi:10.2147/DDDT.S204958

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

ATP	Adenosintrifosfát
CNS	Centrální nervová soustava
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
HPLC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
IGF-1	Růstový faktor podobný inzulinu
IGFBP-3	Vázající růstový faktor podobný inzulinu
ICHS	Ischemická choroba srdeční
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
NAD ⁺	Koenzym nikotinamidadenindinukleotid
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SGLT1	Sodíkovo-glukózový kotransportér
SIRT1	Sirtuin 14
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

10 Samostatné přílohy

Příloha č. 1: Naměřené hodnoty kořenové části Křídlatky japonské

Typ extrakce	Kořen vzorek č.	<i>Trans</i> -Resveratrol (mg/g)	<i>Cis</i> -Resveratrol (mg/g)	<i>Trans</i> -piceid (mg/g)	<i>Cis</i> -Piceid (mg/g)	Emodin (mg/g)	Emodin-Glukosid (mg/g)
Extrakce Methanolem	1	81	11	28	8	44	11
	2	84	9	33	11	49	9
	3	83	12	22	6	53	12
	4	89	14	24	6	47	13
	5	91	10	31	11	51	6
	6	77	17	19	9	46	11
	7	79	16	26	7	39	14
	8	81	14	27	14	51	17
	9	83	19	22	13	38	11
	10	86	13	29	12	39	15
Extrakce směsí Acetonitril-voda	11	58	11	31	9	39	11
	12	47	8	19	7	37	14
	13	55	13	24	11	46	17
	14	58	12	22	9	41	11
	15	60	10	25	10	37	15
	16	77	10	24	6	38	7
	17	74	8	26	7	41	5
	18	83	12	29	9	49	9
	19	69	7	18	5	43	13
	20	61	12	25	8	44	6
Extrakce směsí Methanol-voda	21	94	18	31	13	55	22
	22	80	17	19	11	50	15
	23	85	15	26	12	41	14
	24	93	15	27	12	54	17
	25	98	19	22	7	43	13
	26	89	15	29	10	44	15
	27	84	15	30	10	48	15
	28	87	17	33	14	53	14
	29	79	11	22	8	58	12
	30	91	14	24	10	38	17
Extrakce N ₂	31	101	31	40	20	59	21
	32	104	33	42	21	63	23
	33	103	34	45	24	64	25
	34	109	39	41	22	69	28
	35	101	30	41	23	60	22
	36	107	38	49	28	67	27
	37	109	38	49	27	69	28
	38	101	32	44	23	62	23
	39	103	34	46	24	64	26
	40	106	35	47	26	67	26

Příloha č. 2: Naměřené hodnoty listové části Křídlatky japonské

Typ extrakce	List vzorek č.	<i>Trans</i> -Resveratrol (mg/g)	<i>Cis</i> -Resveratrol (mg/g)	<i>Trans</i> -piceid (mg/g)	<i>Cis</i> -Piceid (mg/g)	Emodin (mg/g)	Emodin-Glukosid (mg/g)
Extrakce Methanolem	1	8	1	3	1	5	1
	2	8	1	3	1	5	1
	3	8	1	2	1	5	1
	4	9	1	2	1	5	1
	5	9	1	3	2	5	1
	6	8	2	2	1	5	1
	7	8	2	3	1	4	1
	8	8	1	3	1	5	1
	9	8	2	2	1	4	1
	10	9	2	2	1	5	1
Extrakce směsí Acetonitril-voda	11	9	2	2	1	5	1
	12	9	2	3	1	4	1
	13	9	1	3	1	5	1
	14	9	2	2	1	4	1
	15	11	3	2	1	5	1
	16	9	1	3	1	5	1
	17	9	2	3	1	5	1
	18	9	1	2	1	5	1
	19	10	2	2	1	5	1
	20	10	2	3	2	5	1
Extrakce směsí Methanol-voda	21	11	3	2	1	5	1
	22	11	3	3	1	4	1
	23	11	2	3	1	5	1
	24	11	3	2	1	4	1
	25	13	3	2	1	5	1
	26	10	2	3	1	5	1
	27	10	3	3	1	5	1
	28	11	2	2	1	5	1
	29	10	3	2	1	5	1
	30	10	3	3	2	5	1
Extrakce N ₂	31	15	4	4	2	7	2
	32	15	4	3	2	6	2
	33	15	4	4	2	6	2
	34	14	4	3	2	7	2
	35	15	4	3	2	7	2
	36	15	4	3	2	7	1
	37	14	4	3	2	7	2
	38	15	4	3	2	7	2
	39	15	4	3	2	7	2
	40	15	4	4	2	7	2

Příloha č. 3: Naměřené hodnoty stonkové části Křídlatky japonské

Typ extrakce	Stonk vzorek č.	<i>Trans</i> -Resveratrol (mg/g)	<i>Cis</i> -Resveratrol (mg/g)	<i>Trans</i> -piceid (mg/g)	<i>Cis</i> -Piceid (mg/g)	Emodin (mg/g)	Emodin-Glukosid (mg/g)
Extrakce Methanolem	1	109	29	26	7	39	14
	2	121	24	27	14	51	17
	3	103	11	22	13	38	11
	4	106	15	29	12	39	15
	5	121	22	36	8	44	11
	6	124	20	43	11	49	9
	7	123	22	42	6	53	12
	8	119	24	44	6	47	13
	9	111	30	31	11	51	6
	10	107	26	19	9	46	11
Extrakce směsí Acetonitril-voda	11	129	34	48	14	53	12
	12	133	38	46	10	57	15
	13	129	38	49	11	54	18
	14	131	35	36	12	56	12
	15	117	31	25	14	53	16
	16	119	32	31	15	54	18
	17	131	37	33	14	56	19
	18	118	30	31	13	54	19
	19	119	31	36	12	57	17
	20	121	35	42	13	51	18
Extrakce směsí Methanol-voda	21	121	36	34	15	55	19
	22	134	37	33	15	58	20
	23	120	37	38	13	56	20
	24	122	35	42	13	59	19
	25	123	35	42	13	53	20
	26	130	38	48	14	55	14
	27	134	38	46	14	57	17
	28	132	38	49	15	56	20
	29	133	35	36	14	58	15
	30	121	35	36	14	55	18
Extrakce N ₂	31	141	40	42	17	61	21
	32	139	39	43	18	59	23
	33	139	41	44	15	57	22
	34	138	40	42	16	59	21
	35	137	40	46	15	55	21
	36	136	40	48	16	56	16
	37	140	40	46	17	60	19
	38	140	38	49	15	59	22
	39	139	41	46	16	61	18
	40	140	39	47	14	55	18

Příloha č. 4: Vypočtené průměrné, minimální, maximální hodnoty a směrodatná odchylka pro kořenovou část

Kořen-průměrná hodnota	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	83,4	13,5	26,1	9,7	45,7	11,9
Extrakce Acetonitril-voda	64,2	10,3	24,3	8,1	41,5	10,8
Extrakce Methanol-voda	88,0	15,6	26,3	10,7	48,4	15,4
Extrakce N ₂	104,4	34,4	44,4	23,8	64,4	24,9
Kořen-minimální hodnota	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	77,0	9,0	19,0	6,0	38,0	6,0
Extrakce Acetonitril-voda	47,0	7,0	18,0	5,0	37,0	5,0
Extrakce Methanol-voda	79,0	11,0	19,0	7,0	38,0	12,0
Extrakce N ₂	101,0	30,0	40,0	20,0	59,0	21,0
Kořen-maximální hodnota	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	91,0	19,0	33,0	14,0	53,0	17,0
Extrakce Acetonitril-voda	83,0	13,0	31,0	11,0	49,0	17,0
Extrakce Methanol-voda	98,0	19,0	33,0	14,0	58,0	22,0
Extrakce N ₂	109,0	39,0	49,0	28,0	69,0	28,0
Kořen-směrodatná odchylka	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	4,1	3,0	4,2	2,8	5,2	2,9
Extrakce Acetonitril-voda	10,6	2,0	3,8	1,8	3,8	3,8
Extrakce Methanol-voda	5,8	2,2	4,3	2,1	6,3	2,7
Extrakce N ₂	3,0	2,9	3,2	2,4	3,4	2,4

Příloha č. 5: Vypočtené průměrné, minimální, maximální hodnoty a směrodatná odchylka pro listovou část

List-průměrná hodnota	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	8,3	1,4	2,5	1,1	4,8	1,0
Extrakce Acetonitril-voda	9,4	1,8	2,5	1,1	4,8	1,0
Extrakce Methanol-voda	10,8	2,7	2,5	1,1	4,8	1,0
Extrakce N ₂	14,8	4,0	3,3	2,0	6,8	1,9
List-minimální hodnota	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	8,0	1,0	2,0	1,0	4,0	1,0
Extrakce Acetonitril-voda	9,0	1,0	2,0	1,0	4,0	1,0
Extrakce Methanol-voda	10,0	2,0	2,0	1,0	4,0	1,0
Extrakce N ₂	14,0	4,0	3,0	2,0	6,0	1,0
List-maximální hodnota	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	9,0	2,0	3,0	2,0	5,0	1,0
Extrakce Acetonitril-voda	11,0	3,0	3,0	2,0	5,0	1,0
Extrakce Methanol-voda	13,0	3,0	3,0	2,0	5,0	1,0
Extrakce N ₂	15,0	4,0	4,0	2,0	7,0	2,0
List-směrodatná odchylka	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	0,5	0,5	0,5	0,3	0,4	0,0
Extrakce Acetonitril-voda	0,7	0,6	0,5	0,3	0,4	0,0
Extrakce Methanol-voda	0,9	0,5	0,5	0,3	0,4	0,0
Extrakce N ₂	0,4	0,0	0,5	0,0	0,4	0,3

Příloha č. 6: Vypočtené průměrné, minimální, maximální hodnoty a směrodatná odchylka pro stonkovou část

Stonek-průměrná hodnota	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	114,4	22,3	31,9	9,7	45,7	11,9
Extrakce Acetonitril-voda	124,7	34,1	37,7	12,8	54,5	16,4
Extrakce Methanol-voda	127,0	36,4	40,4	14,0	56,2	18,2
Extrakce N ₂	138,9	39,8	45,3	15,9	58,2	20,1
Stonek-minimální hodnota	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	103,0	11,0	19,0	6,0	38,0	6,0
Extrakce Acetonitril-voda	117,0	30,0	25,0	10,0	51,0	12,0
Extrakce Methanol-voda	120,0	35,0	33,0	13,0	53,0	14,0
Extrakce N ₂	136,0	38,0	42,0	14,0	55,0	16,0
Stonek-maximální hodnota	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	124,0	30,0	44,0	14,0	53,0	17,0
Extrakce Acetonitril-voda	133,0	38,0	49,0	15,0	57,0	19,0
Extrakce Methanol-voda	134,0	38,0	49,0	15,0	59,0	20,0
Extrakce N ₂	141,0	41,0	49,0	18,0	61,0	23,0
Stonek-směrodatná odchylka	<i>Trans-R</i>	<i>Cis-R</i>	<i>Trans-P</i>	<i>Cis-P</i>	Emodin	Emodin-G
Extrakce Methanol	7,6	5,6	8,5	2,8	5,2	2,9
Extrakce Acetonitril-voda	6,1	2,8	7,7	1,5	1,9	2,5
Extrakce Methanol-voda	5,7	1,3	5,6	0,8	1,7	2,1
Extrakce N ₂	1,4	0,9	2,3	1,1	2,2	2,1