

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Prírodovedecká fakulta
Katedra analytickej chémie

Kyselina salicylová v rastlinnom materiály

Bakalárska práca

Autor:	Eva Bištiaková
Študijný odbor:	Chémia- Geológia a ochrana životného prostredia
Forma štúdia:	prezenčná
Vedúci práce:	doc. RNDr. Petr Barták, Ph. D.

Olomouc 2012

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Eva Bištiaková
Názov práce	Kyselina salicylová rastlinnom materiály
Typ práce	Bakalárska práca
Pracovisko	Katedra analytickej chémie
Vedúci práce	doc. RNDr. Petr Barták, Ph. D.
Rok obhajoby	2012

Abstrakt

Kyselina salicylová alebo kyselina 2-hydroxybenzoová, staršie tiež salicyl s chemickým vzorcom $C_6H_4(OH)COOH$. Jej názov pochádza z latinského názvu pre vrbu, *Salix*, z ktorej kôry možno kyselinu izolovať. Teoretická časť bakalárskej práce sa venuje histórii kyseliny salicylovej a objavu Aspirínu. Zameriava sa na hlavnú úlohu kyseliny salicylovej v rastlinách, účinkom kyseliny salicylovej a jej derivátov na ľudský organizmus a ich využitie v modernej medicíne. Pozornosť je tiež venovaná extrakčným metódam a separačným analytickým metódam. Praktická časť práce sa zaoberá stanovením celkového obsahu kyseliny salicylovej v rastlinnom materiály pomocou plynovej chromatografie spojenej s hmotnostnou spektrometriou. Bolo zistené, že najviac kyseliny salicylovej obsahuje čerstvá (nesušená ani inak neupravovaná) kôra z mladých výhonkov v jarných mesiacoch.

Kľúčové slová: kyselina salicylová, salicylany, vrba biela, aspirín.

Počet strán: 47

Jazyk: Slovenský

Bibliographic identification

Name and surname of author	Eva Bištiaková
Name of thesis	Salicylic acid in Vegetable Materials
Type of thesis	Bachelor thesis
Department	Department of Analytical Chemistry
Thesis supervisor	doc. RNDr. Petr Barták, Ph. D.
Year of completion	2012

Abstract

Salicylic acid or 2-hydroxybenzoic acid, or as earlier termed salicyl, with the chemical formula $C_6H_4(OH)COOH$. Its name comes from Latin *salix*, willow tree, from the bark of which acid can be isolated. The theoretical part of the thesis is devoted to the history of the discovery of salicylic acid and aspirin. It focuses on the central role of salicylic acid in plants, the effect of salicylic acid and its derivatives on the human body and their use in modern medicine. Attention is also given to methods of extraction and analytical separation. The practical part deals with the determination of total amount of salicylic acid in plant materials by gas chromatography combined with mass spectrometry. It was found that fresh bark (not dried or otherwise prepared) of young shoots in spring months contains the largest amount of salicylic acid.

Key words: salicylic acid, salicylates, white willow, aspirin.

Number of pages: 47

Language: Slovak

Prehlasujem, že som prácu vypracovala samostatne. Všetky literárne zdroje a informácie, ktoré som v práci využila, sú v zozname použitej literatúry.

V Olomouci dňa.....

.....
Vlastnoručný podpis

Pod'akovanie

Ďakujem doc. RNDr. Petrovi Bartákovi, Ph.D.
za odborné vedenie a pomoc, ktorú mi poskytol pri
vypracovaní mojej práce.

Eva Bištiaková

OBSAH

Úvod.....	8
I Teoretická časť	9
1 História salicylanov.....	9
1.1 Zdravie zo stromov.....	9
1.2 Od salicylu k aspirínu.....	11
1.3 Zázračná molekula Felixa Hoffmanna.....	12
1.4 Mechanizmus účinku a použitie kyseliny acetylsalicylovej.....	13
1.5 Príprava a výroba kyseliny acetylsalicylovej.....	14
2 Fenolické látky.....	15
2.1 Fenolické glykozidy.....	16
2.2 Kyselina salicylová.....	17
2.3 Úloha kyseliny salicylovej v rastlinách.....	17
3 Prírodné zdroje kyseliny salicylovej.....	21
4 Deriváty kyseliny salicylovej v ľudskom organizme.....	22
4.1 Chemická štruktúra salicylanov.....	22
4.2 Vstrebávanie salicylanov.....	23
4.3 Distribúcia salicylanov.....	23
4.4 Biotransformácia salicylanov.....	24
4.5 Vylučovanie salicylanov.....	24
4.6 Účinky salicylanov na ľudský organizmus.....	24
5 Využitie derivátov kyseliny salicylovej v modernej medicíne.....	26
6 Interakcie salicylanov v ľudskom organizme s vybranými liečivami.....	27
7 Extrakcia a chemické analýzy.....	31
7.1 Extrakcia.....	31
7.2 Chemické analýzy kyseliny salicylovej.....	31
7.2 Plynová chromatografia GC.....	33
II Praktická časť	35
1 Cieľ výskumu.....	35
2 Materiál a metodika.....	35
2.1 Odber vzoriek.....	35

2.2	Chemikálie.....	35
2.3	Prístrojové vybavenie.....	36
2.4	Extrakcia kyseliny salicylovej z vrby bielej (<i>Salix alba</i>).....	36
2.5	Stanovenie kyseliny salicylovej pomocou GC/MS.....	36
3	Výsledky a diskusia.....	37
4	Záver.....	41
	Použitá literatúra.....	42
	Zoznam skratiek.....	47

ÚVOD

Zdravie je to najcennejšie čo máme. Aj keď túto dôležitú skutočnosť si častokrát uvedomíme až vtedy, keď ochorieme. Potom nám neostáva nič iné, len sa liečiť a to bez farmakologických prípravkov takmer nejde. Lieky sú v podstate biologicky aktívne organické zlúčeniny s definovaným fyziologickým účinkom v organizme. Táto skoro definícia zahŕňa napríklad aj látky prírodného charakteru vo forme extraktov či už z baktérií, rastlín alebo živočíchov. Nakoniec značné množstvo dnes používaných antibiotík sú molekuly, ktoré boli pôvodne biosyntetizované rôznymi mikroorganizmami na ich sebaobranu. Aj účinné cytostatikum Taxol, ktoré sa v súčasnosti používa na liečbu rakoviny prsníka a vaječníkov, je látka izolovaná z kôry tisu pacifického. Ale vzhľadom na vysoké ekonomické náklady, ktoré sú spojené s izoláciou a čistením aktívnych substancií z prírodných zdrojov, sa drvivá väčšina liekov v súčasnosti pripravuje výlučne synteticky. Moderné preparatívne metódy organickej chémie totiž nielen že umožňujú ich lacnejší spôsob výroby, ale najmä ponúkajú aj potrebnú variabilitu procesov nevyhnutnú pre výskum a vývoj nových a účinnejších liečiv, než aké nám poskytuje príroda.

Liečebné účinky vrb boli využívané v humánnej medicíne už pred dvetisíc rokmi v období antického Ríma, resp. starého Egypta. Aj v ľudovom liečiteľstve u nás spomína napr. Juraj Fándly (r. 1793) liečenie horúčky vrbovým listím zmiešaným so slezom. Vrbová kôra sa používala v ľudovom liečiteľstve nielen pri liečení horúčky ale aj pri liečení katarov tráviaceho traktu, hnačiek. Po zavedení syntetickej výroby kyseliny salicylovej a jej derivátov, sa využívanie vrbovej kôry v humánnej medicíne postupne obmedzilo.

Teoretická časť práce sa zaoberá históriou kyseliny salicylovej (SA), hlavnou úlohou a syntézou SA v rastlinách, derivátmi kyseliny salicylovej, ich účinkami na ľudský organizmus a ich využitím v dnešnej medicíne, farmakológiou nesteroidných antiflogistík a analgetík-antipiretík a ich prirodzeným zdrojom v potravinách. Cieľom praktickej časti je zisťovanie množstva kyseliny salicylovej chemickou analýzou vzoriek z vrby bielej.

TEORETICKÁ ČASŤ

1 História používania salicylanov

1.1 Zdravie zo stromov

Stromy, konkrétne niektoré ich časti a látky ktoré produkujú boli už od dávna využívané pre ich nenahraditeľné liečivé a blahodárne účinky na ľudské zdravie. Veľa z ich účinkov a prospešných vlastností je už známych, mnohé ďalšie sa objavujú postupne.¹

Kyselina salicylová je súčasťou glykozidu salicínu, ktorý sa nachádza v kôre vŕby (*Salix alba*).⁵ Vŕba biela rastie v nížinách a pahorkatinách teplých oblastí. Areál rozšírenia zahŕňa okrem Európy aj severozápadnú Afriku, Prednú a Strednú Áziu smerom až na Sibír. Kôra vŕby bielej sa zbiera na jar, najlepšie v marci, z 2 až 3-ročných vetví. Kôra sa nareže a lúpe v pásoch cca 25 cm dlhých. Suší sa pri 40-60 °C. Vŕbová kôra nevoní a chutí horko.²

Čínsky lekári používali kôru vŕby bielej na zmiernenie bolesti už v roku 500 pr.Kr. Trvalo celých 500 rokov kým sa ich skúsenosť dostala aj do Európy. Grécky lekár 1.storočia Dioskorides bol prvým človekom na Západe, ktorý odporúčal kôru vŕby proti bolesti a zápalom, ale jeho rady sa moc neujali. O storočie neskôr predpisoval rímsky lekár Galen vŕbu len k „vysušeniu telesných tekutín.“³ Postupom času predpisovali bylinkári kôru vŕby bielej na mnoho ďalších neduhov. Anglický bylinkár 17. storočia Nicholas Culpeper napísal: „Listy, kôra a semená sa používajú k zastaveniu krvácania, vracania, k podpore tvorby moču...“. V tej dobe nebola vŕba používaná proti bolesti, ale Culpeper sa zastával názoru pána Stona, ktorý poukazoval na jej „vysokú účinnosť ... pri prerušovanej horúčke (malárii)“.

3



Obr. 1 Vľba biela (prevzaté z literatúry 4)

Antipyretické účinky extraktov z kôry vľby opísal r. 1763 Stone.⁵ Culpeper usudzoval, že kôra vľby bielej „by sa mala stať rastlinnou, ktorá si zaslúži pozornosť.“ Jeho názory vychádzali z výskumu Edmunda Stonea, lekára ktorý hľadal náhradu za kôru chinovníka pochádzajúceho z Južnej Ameriky. Kôra chinovníka síce bola prvým liekom proti malárii, ale bola veľmi drahá. V roku 1757 nazbieral Stone kôru vľby bielej pre liečebné účely popisované Culpeprom a náhodou ich skúsil. Bol prekvapený horkou chuťou, ktorá mu pripomínala chuť chinovníkovej kôry. Stone sa preto začal zaujímať o možnosť náhrady chinovníka vľbou bielou a tým získaniu lacného lieku pre chudobných ľuď trpiacich horúčkou, alebo maláriou. Počas šiestich rokov drvil Stone vľbovú kôru na prášok, varil z nej čaj a podával tento skúšobný liek 50 ľuďom s horúčkami. Stone tvrdil, že u väčšiny pacientov zmizli horúčky a zimnice krátko po vypití jeho lieku. Stone napísal správu nazývanú „Správa o úspechu dosiahnutom pri podávaní kôry vľby bielej pri zimniciach.“³

25. apríla 1763 poslal Stone svoju správu Kráľovskej spoločnosti (Royal Society), najprestížnejšej vedeckej organizácii v Anglicku. Skoro po tom, čo ju Kráľovská spoločnosť v tom istom roku vydala vo svojom časopise Philosophical Transactions, sa stala kôra vľby bielej obľúbeným západným prostriedkom proti horúčke – o viac ako 2 000 rokov neskôr, ako ju za rovnakým účelom začali používať v Číne.³

1.2 Od salicylu k aspirínu

Roku 1827 Leroux objavil glykozid salicín. Zo salicínu vzniká hydrolyzou alkohol saligenín, z ktorého r. 1838 Piria pripravil kyselinu salicylovú.⁵

V polovici 19. storočia vedci dokázali, že salicin a kyselina salicylová znižujú horúčku a prinášajú úľavu od bolesti a zápalov. Bohužiaľ u nich boli zároveň zistené aj nepríjemné a nebezpečné vedľajšie účinky (nevoľnosť, hnačky, krvácanie, tvorba žalúdočných vredov..). Chemici začali kyselinu salicylovú upravovať, aby pri zachovaní jej liečivých účinkov odstránili nežiaduce vedľajšie efekty. V roku 1853 naacetylovali nemeckí chemici výťažok z tužobníka a tým získali kyselinu acetylsalicylovú. Táto látka mala stále niekoľko nežiadúcich účinkov, ale zato bola omnoho účinnejšia, pretože dokázala prekonať hematoencefalickú bariéru. Kyselina acetylsalicylová bol pomerne ťažko vysloviteľný názov a preto ju vedci, ktorí ju objavili, skrátili na „a-“ (namiesto *acetyl*) a „-spirín“, odvodené od vtedy platného druhového latinského mena tužobníka (*Spirea*), a vytvorili tak názov **aspirín**.³

Správa o syntéze aspirínu bola publikovaná v neznámom vedeckom časopise a 50 rokov si na ňu nikto nespomenul. Na konci 90. rokov 19. storočia sa nemecký chemik Felix Hoffman nahneval, pretože v tej dobe podávané lieky neprinášali jeho otcovi skoro žiadnu úľavu. Hoffman zamestnaný vo firme Fredrich Bayer and Company začal hľadať niečo, čo by jeho otcovi uľavilo od jeho bolesti. Vrhol sa do pozerania časopisov a našiel staré správy o aspiríne. Potom tento liek pripravil, priniesol svojmu otcovi a jeho stav sa výrazne zlepšil. Hofmanovi nadriadení vo firme Fredrich Bayer and Company spočiatku nevenovali aspirínu žiadnu pozornosť, ale to sa hneď zmenilo. Neskôr firma Bayer v súdnom spore o značku Aspirín svoje práva prehrala, pretože súd vyniesol rozsudok, že tento termín sa už stal všeobecne používaným.³

1.3 Zázračná molekula Felixa Hoffmanna



Obr.2 Felix Hoffmann (prevzaté z literatúry 6)

Existuje niekoľko dobrých dôvodov sa domnievať, že Aspirin bezpochyby patrí medzi najdôležitejšie lieky, aké kedy človek objavil. Ten prvý dôvod je určite jeho široká dostupnosť pre milióny pacientov na celom svete s vynaložením iba malých finančných nákladov. Ďalej je to jeho relatívne bezpečné užívanie aj bez potrebnej konzultácie u lekára, takmer nulové riziko vzniku závislosti, ako aj mimoriadne nízka toxicita. A práve vďaka týmto výhodným vlastnostiam bol Aspirin po dlhý čas najpoužívanejšie liečivo na svete, čím priniesol obrovské bohatstvo nemeckej firme Bayer, ktorá ho ako prvá uviedla na trh. A nakoniec, kyselina acetylsalicylová, ako sa retrospektívne ukázalo, predstavuje mimoriadny prínos pre biomedicínske vedy. Experimentálne zistenie mechanizmu jej účinku hralo totiž kľúčovú úlohu pri objave arachidónovej biochemickej kaskády, jednej z dôležitých súčastí obranyschopnosti ľudského organizmu. Za kľúčový príspevok k objasneniu jej významnej biologickej funkcie bola dokonca v roku 1982 udelená Nobelova cena za fyziológiu a medicínu (S. K. Bergström, B. I. Samuelsson, J. R. Vane).⁷



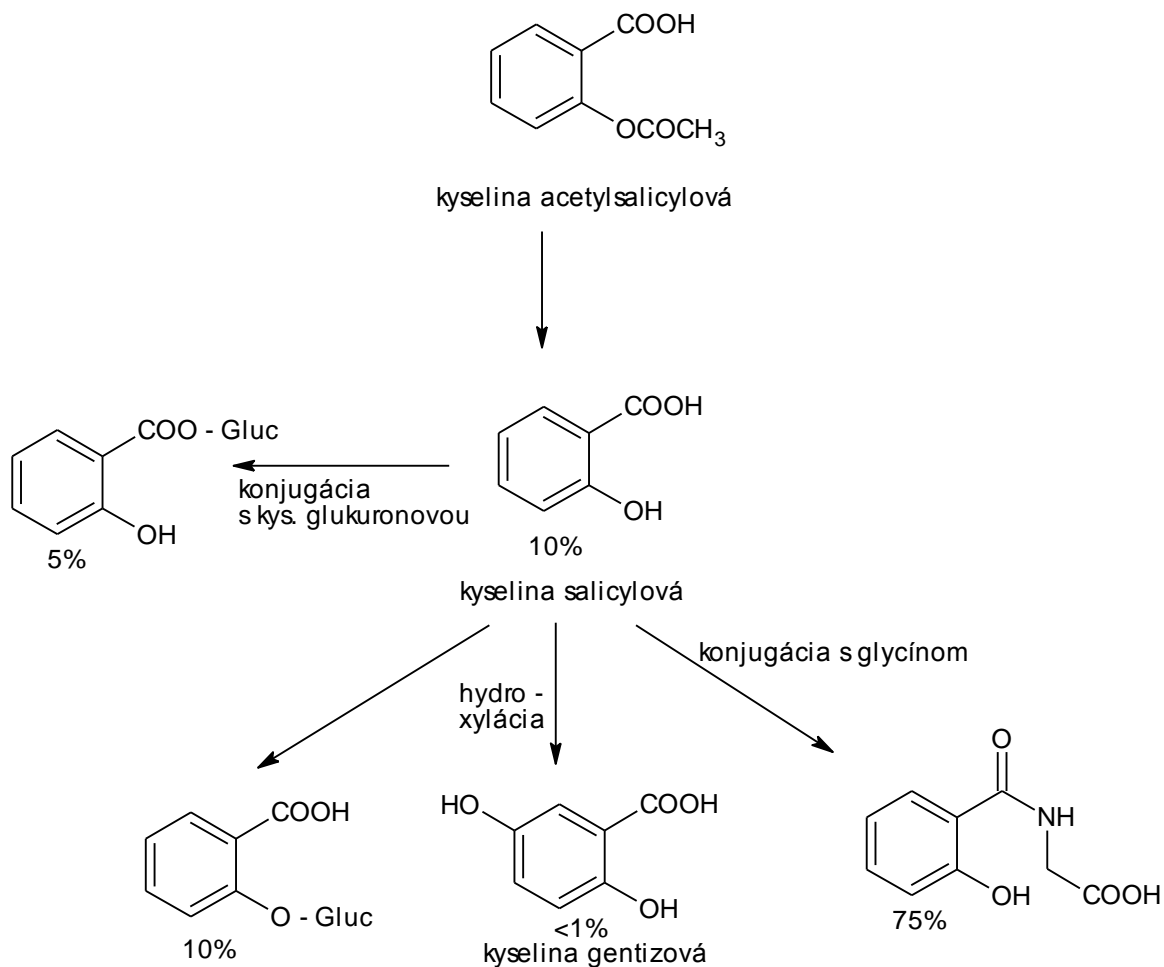
Obr.3 Aspirin (prevzaté z literatúry 8)

1.4 Mechanizmus účinku a použitie kyseliny acetylsalicylovej

Kyselina acetylsalicylová obsahuje labilnú acetátovú skupinu, ktorá sa po uvoľnení môže kovalentne naviazať na makromolekulu cyklooxygenázy.

Acetylizácia ireverzibilne inaktivuje cyklooxygenázu, to hrá potlačením syntézy tromboxanu A₂ v trombocytoch dôležitú úlohu pri inhibícii agregácie trombocytov. Tento špeciálny spôsob inhibície cyklooxygenázy je vlastný iba kyseline acetylsalicylovej a dá sa ho dosiahnuť už nízkym dávkovaním kyseliny acetylsalicylovej, 0,03 – 0,1g denne. Pri porovnaní terapeutickej hodnoty s frekvenciou a závažnosťou nežiaducich účinkov vychádza pre kyselinu acetylsalicylovú relatívne priaznivé hodnotenie, takže sa jej použitie ako analgetikum a ako antipyretikum dá doporučiť. Pretože kyselina acetylsalicylová inhibuje omnoho silnejšie cyklooxygenázu 1 než cyklooxygenázu 2, je výskyt nežiaducich účinkov pravdepodobný.⁹

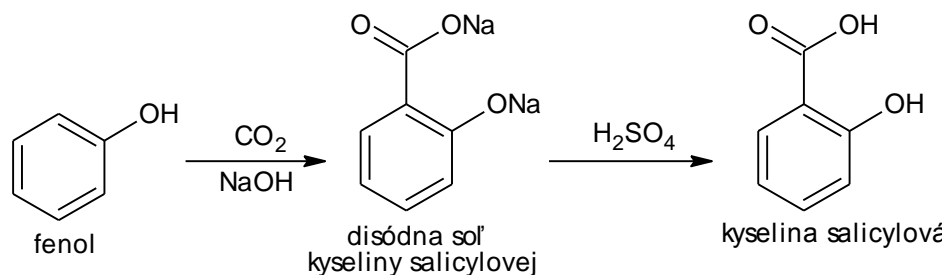
Resorbcia kyseliny acetylsalicylovej zo žalúdka a z čreva je rýchla a úplná. Acetátová skupina sa v organizme rýchlo odštiepi a uvoľnená kyselina salicylová sa v plazme v závislosti na dosiahnutej koncentrácii viaže na bielkoviny z 80–95 %. V pečeni sa z časti konjuguje s glycínom a s kyselinou glukuronovou, malý podiel sa oxiduje na kyselinu gentizovú (pozri obr. 4).⁹



Obr.4 Metabolizmus kyseliny acetylsalicylovej (prevzaté z literatúry 9)

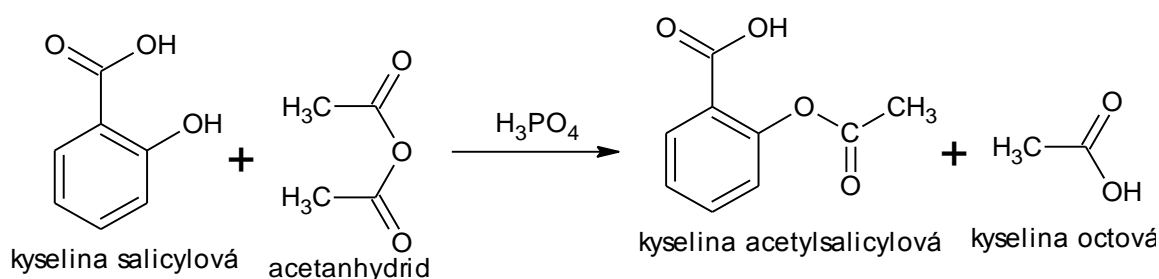
1.5 Príprava a výroba kyseliny acetylsalicylovej

Kyselina acetylsalicylová sa pripravuje dvojstupňovou syntézou z bežne dostupného fenolu. V prvom stupni sa Kolbeho-Schmittovou reakciou fenolu s oxidom uhličitým za vysokého tlaku a za prítomnosti nadbytku hydroxidu sodného pripraví disódna soľ kyseliny salicylovej, z ktorej sa voľná kyselina uvoľní pôsobením kyseliny sírovej (Obr.5).²²



Obr.5 Príprava kyseliny salicylovej Kolbeho-Schmittovou syntézou (prevzaté z literatúry 22)

Zahrievaním kyseliny salicylovej s acetanhydridom za prítomnosti kyseliny fosforečnej ako kyslého katalyzátora dôjde k reakcii hydroxylovej skupiny s acetanhydridom (esterifikácii), čím vzniká kyselina acetylsalicylová (Obr.6).²²



Obr.6 Príprava kyseliny acetylsalicylovej (prevzaté z literatúry 22)

2 Fenolické látky

V rastlinách bolo identifikovaných niekoľko tisíc fenolických látok s ohromnou rozmanitosťou štruktúr. Spoločným rysom je, že obsahujú jedno alebo viacej aromatických jadier substituovaných hydroxylovými skupinami.

Fenolické látky sú prírodné antioxidanty. Nachádzajú sa v rôznych častiach rastlín, napr. listy, korene, kôra, plody. Podľa štruktúry rozdeľujeme fenolické látky do niekoľkých skupín.¹⁰

Na jednoduché fenoly, fenolkarboxylové kyseliny, fenypropanoidy a flavonoidy. Do skupiny jednoduchých fenolov zaraďujeme látky s jednoduchou štruktúrou obsahujúcou cyklické

(aromatické) C₆ reťazce. Základný skelet molekuly často substituujú metylové skupiny. Jednoduché fenoly nie sú v prírode až tak časté, patrí k nim napr. hydrochinon. Medzi fenolkarboxylové kyseliny zaraďujeme látky, ktoré obsahujú vo svojej molekule štruktúru C₆-C₁ skelet. Môžu to byť napr. kyselina pyrokatechová, gallová, *p*-hydroxybenzoová. Tieto látky sú v rastlinnej ríši bežne zastúpené. Fenylpropanoidy vo svojej štruktúre obsahujú aromatický kruh s naviazaným C₃ reťazcom. Táto skupina je pomerne rozsiahla, patrí sem napr. kumariny, lignin a typickými zástupcami sú deriváty kyseliny škoricovej (kyselina *p*-kumárová, ferulová, kávová, sinapová,...). V rastlinách sa bežne vyskytuje tiež skupina flavonoidov. Štruktúra flavonoidu je zložená z dvoch častí, prvú tvorí C₆-C₃ reťazec, ktorý je vytvorený šikimátovou metabolickou dráhou a druhú časť tvorí C₆ s naviazaným atómom kyslíka. Druhá časť molekuly vzniká odvodením od acetátu. Flavonoidy rozdeľujeme na podskupiny, a to flavony, flavonoly a antokyany.^{11, 12}

V prírode veľmi dôležité fenolické kyseliny zohrávajú dôležitú úlohu v ochrane rastlín. Rastlinné fenolické kyseliny sa môžu vyskytovať viazané vo forme glykozidov alebo esterov a vo forme voľnej. Štruktúra ich molekúl je odvodená od kyseliny benzoovej alebo škoricovej. K hydroxybenzoovým kyselinám patrí napr. kyseliny gallová, vanilová, gentizová, salicylová atd. Medzi hydroxyškoricové kyseliny môžeme zaradiť napr. kyselinu ferulovú, kávovú, *p*-kumárovú atd.¹¹

2.1 Fenolické glykozidy

Fenolické glykozidy obsahujú sacharid naviazaný na fenolickú skupinu. Mnohé fenolické látky sú v rastline prítomné v glykozidickej forme, ktorá sa po zbere odštiepuje a uvoľňuje sa tak sama aktívna zlúčenina. To je napr. prípad vanilínu alebo salicínu.

Kyseliny salicylová je aglykónom glykozidu gaulterinu, ktorý sa vyskytuje napr. v severoamerickom druhu *Gaultheria procumbens* (vresovcovité) a tiež v našich druhoch briez (*Betula* sp.). Gaulterin má charakteristický zápach, hydrolyzuje na primverosu a metylester kyseliny salicylovej. V kôre vrby (*Salix* sp.) sa vyskytuje glykozid salicín a tiež voľná kyseliny salicylová.¹³

2.2 Kyselina salicylová

Kyselina salicylová je vo forme glykozidu salicínu obsiahnutá vo vrbovej kôre, používanej odpradáva v ľudovom liečiteľstve k potlačovaniu horúčky.¹⁴ Kyselina salicylová (Acidum salicylicum) je biely prášok zle rozpustný vo vode (1 : 460) a dobre v alkohole (1 : 3).⁵

SA ako rastlinný hormón sa nachádza všade v rastlinách, má významný vplyv na rast a vývoj rastlín, fotosyntézu, dýchanie, iontovú výmenu a tiež vyvoláva špecifické zmeny v anatómii a chloroplastoch listovej štruktúry. SA je uznávaná ako endogénny signál sprostredkovania rastlinnej obrany proti patogénom.¹⁵

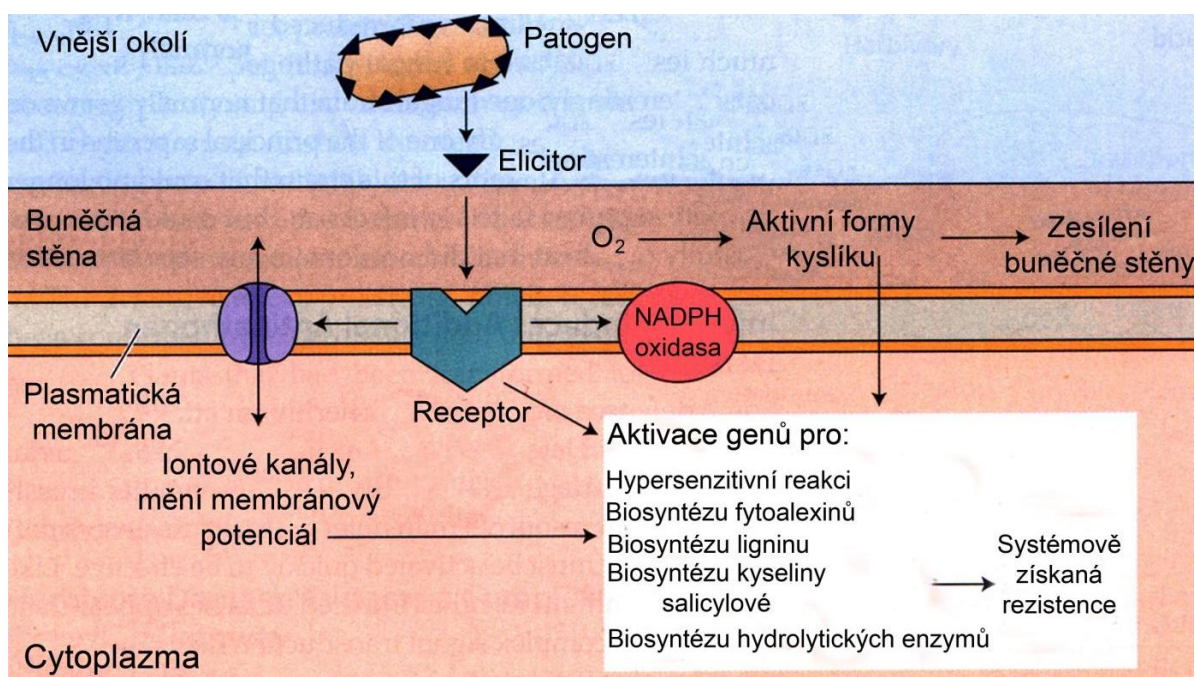
2.3 Úloha kyseliny salicylovej v rastlinách

Rast a vývoj rastlín je regulovaný vzájomnými interakciami rastlinných hormónov, medzi ktoré zaradíme tieto skupiny látok: gibberlliny, auxiny, cytokininy, kyselinu abscisovú a etylén. Medzi rastlinné regulátory ďalej patria oligosacharidy, brassinosteroidy, jasmonáty, kyselina salicylová a polyamidy.¹⁶

S kyselinou salicylovou je priamo spojený fenomén *Systémovo získanej rezistencie*. Rastliny po inokulácii spravidla avirulentným patogénom môžu aj v častiach vzdialených od miesta inokulácie vykazovať značnú mieru rezistencie k virulentným patogénom. Takáto rezistencia môže v rastlinách pretrvávajú dlhú dobu.¹⁷ SAR je aktivovaná lokálnymi nekrozami spôsobenými hubovou, bakteriálnou alebo vírusovou infekciou. V experimentoch s rastlinami tabaku sa ukázalo, že k tomu, aby sa vytvorila systémovo získaná odolnosť, musí najprv dôjsť k nahromadeniu SA. Expresia salicyláhydroxylázového génu v rastlinách vytvára naopak rastlinu so zvýšenou schopnosťou k ochoreniu. Prítomnosť SA alebo jej funkčného analóga kyseliny 2,6-dichloroisonikotinovej môže zvrátiť citlivosť v odolnosť. Zaujímavé je, že podobné efekty boli popísané aj u porúch imunitného systému cicavcov.⁴¹ Hlavnou zložkou SAR je zvýšená hladina tzv. PR – proteínov (patogenesis related) v doteraz napadnutých bunkách infikovanej rastliny.¹⁸ Proteíny sú produkované rastlinami ako odpoveď na infekciu spôsobenú vírusmi, baktériami, či hubami. Sú to monoméři s nízkou molekulovou

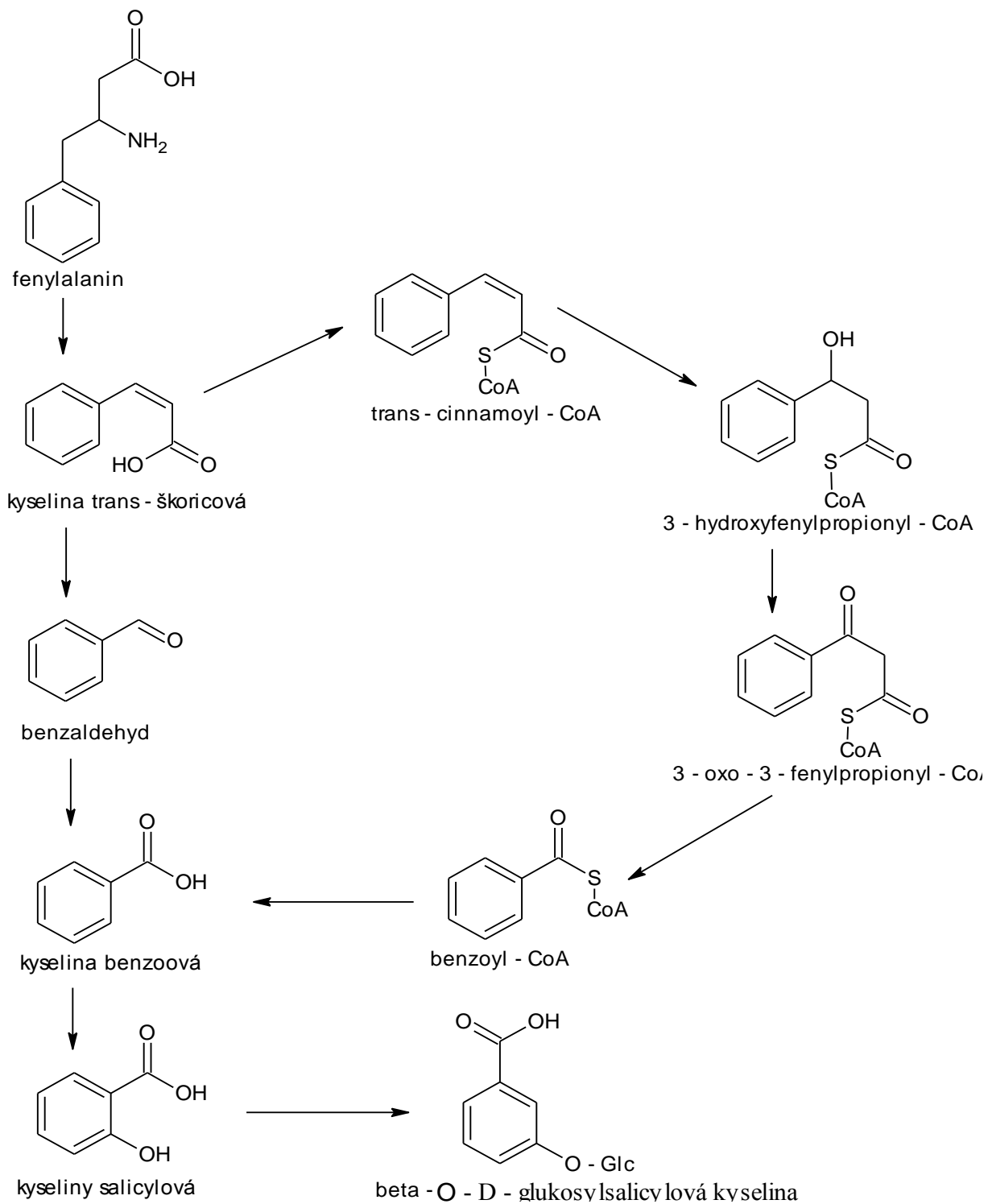
hmotnosťou (8-50 kDa). PR proteíny sú veľmi stabilné aj za nízkeho pH ($\text{pH} < 3$), kedy sú iné proteíny už denaturované, tiež sú veľmi odolné voči pôsobeniu proteolytických enzýmov endogenného aj exogenného pôvodu.^{19, 20} PR proteíny sa nachádzajú vo vakuolách, v bunečnej stene, v apoplastoch a sú prítomné vo všetkých rastlinných tkanivách.²⁰ SAR nemusí byť spustená iba rozpoznávaním génu avirulencie, ale tiež endogennými elicitorami alebo abiotickým stresom.¹⁸ Signál k obrannej reakcii sa šíri nie len v napadnutej rastline, ale môže sa tiež šíriť v rastlinách okolitých pomocou prchavého metylesteru kyseliny salicylovej.²¹

Samotné rozpoznanie patogéna rastlinou však pred infekciou neochráni. Signál je od receptorov vedený zložitou spleťou signálnych dráh, ktoré zaistia preprogramovanie transkriptomu. Batérie nových proteínov potom spoločným pôsobením zabráni patogénom v infekcii.²³ Kľúčovú úlohu v prenose signálu od receptorov hrajú rastlinné hormóny, a to hlavne kyselina salicylová, etylén, a kyselina jasmonová.²⁴ Ústrednou molekulou SAR je kyselina salicylová. Bolo dokázané, že SA má niekoľko funkcií priamo spojených so vznikom SAR a obranou rastliny. V prvom rade ide o signalizáciu pri vzniku SAR. Je dokázané, že pre expresiu PR-génov je SA nepostrádateľná. SA naakumulovaná v zdravých pletivách priamo pochádza z napadnutého listu, ale nepotvrdilo sa, že by priamo SA bola primárnym signálom vzniku SAR vo vzdialených pletivách²⁵, viac obr. 7.



Obr. 7 Priebeh vzniku SAR u rastlín (prevzaté z literatúry 26)

Ďalšou z funkcií SA je inhibícia, čo vedie k zvýšenej koncentrácii peroxidu vodíka a reaktívnych zlúčenín kyslíka z neho vznikajúcich. Táto funkcia sa však javí ako vedľajšia, pretože koncentrácia SA je pomerne nízka. Po inhibícii enzýmov obsahujúcich hem, napr. kataláza alebo peroxidáza je SA schopná tvoriť voľné radikály, ktoré sú považované za iniciátora peroxidácie lipidov. Neinfikované listy infikovanej rastliny obsahujú nízke hladiny SA, čo môže výrazne ovplyvniť priebeh a načasovanie oxidačného vzplanutia pri opätovnom kontakte s patogénom.²⁵ V rastlinnom organizme sú fenolické látky, teda aj SA syntetizované z *trans*-škoricevej kyseliny, ktorá vzniká z L-fenylalanínu reakciou katalyzovanou enzýmom L-fenylalaninamoniumlyázou.⁴¹ (pozri obr.). Postupným skracovaním reťazca kyseliny *trans*-škoricevej vznikne kyselina benzoová. Mechanizmus, ktorým sa kyselina *trans*-škoricevá premieňa na kyselinu benzoovú dodnes nebol presne objasnený. Pravdepodobne vzniká β -oxidáciou, kedy sa kyselina *trans*-škoricevá premieňa na 3-hydroxy-3-fenylpropionyl-CoA a ďalej až na benzoyl-CoA. Z benzoyl-CoA následne vzniká kyselina benzoová. Inou cestou môže byť vznik kyseliny benzoovej cez benzaldehyd. Za pomoci hydroxylázy je kyselina benzoová následne premenená na kyselinu salicylovú. SA sa následne pomocou salicylátglukosyltransferázou konjuguje s glukózou za vzniku β -O-D-glukosylsalicylovej kyseliny.^{27, 28, 29} Schéma biosyntézy SA je znázornená na obr. 8.



Obr.8 Biosyntéza kyseliny salicylovej v rastlinách.

3 Prirodzené zdroje kyseliny salicylovej

Salicylany sa prirodzene vyskytujú v ovocí, zelenine, bylinkách, korení a iných druhoch rastlín. Častá konzumácia týchto potravín vedie k vytvoreniu rovnakej hladiny salicylanov v krvi ako pri podávaní nízkych dávok aspirínu. Naopak nízka konzumácia ovocia a zeleniny môže mať nepriaznivý vplyv na zdravie. Na množstvo salicylanov má tiež vplyv spôsob ošetrovania rastlín pri pestovaní. Napríklad chemicky neošetrená zelenina má vyšší obsah salicylanov ako zelenina chemicky ošetrená.³⁰

Kyselina salicylová je produkovaná rastlinami ako ochrana proti stresu a chorobám. Toto môže potom slúžiť ako vysvetlenie jej vyššieho obsahu v zelenine dopestovanej ekologicky bez použitia pesticídov. John Paterson a jeho tím z Univerzity v Strathclyde objavili, že polievky pripravené z ekologicky dopestovanej zeleniny obsahovali šesťkrát viac kyseliny salicylovej v porovnaní s polievkami pripravenými zo zeleniny dopestovanej konvenčným spôsobom.³¹

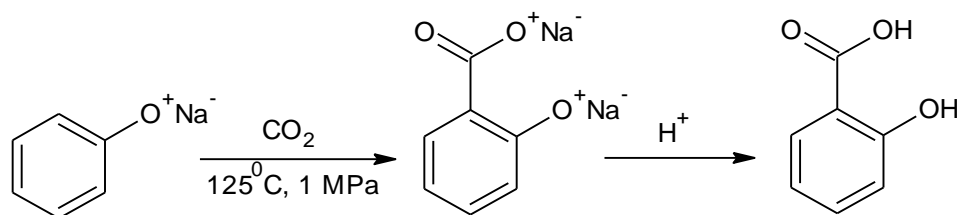
Ovocie a zelenina – Počas spracovania ovocia a zeleniny napr. pri varení, mrazení, alebo sušení dochádza k veľmi významným stratám kyseliny salicylovej. Jej obsah v čerstvých produktoch je preto vyšší.

Najbohatším zdrojom kyseliny salicylovej z ovocia sú citróny (3,2 mg/kg), samozrejme v citrónovej malinovke je obsah SA podstatne nižší (<0,01 mg/kg). Čerstvé hrozno má tiež vyššie množstvo (0,6, mg/kg) ako hrozienka (0,2, mg/kg). Takisto je hladina obsahu SA nízka aj v džemoch. Ďalšie ovocie s vyšším pomerom SA sú napríklad slivky (0,5 mg/kg) a banány (0,4 mg/kg). Dobrým zdrojom SA sú čerstvé paradajky (1,3 mg/kg), paradajkový pretlak má tiež obsah SA podstatne nižší (0,3 mg/kg). Mrkva obsahuje (0,5 mg/kg), uhorky (0,4 mg/kg) alebo mrazený hrach (0,3 mg/kg) patrí tiež medzi zeleninu s vyšším obsahom salicylanov.³²

Bylinky a korenie – z tejto skupiny majú vysoké hladiny SA napríklad timián, oregano, bylinkové zmesi, kari korenie alebo mäta (14,4 – 28,6 mg/kg). Nižšie množstvo obsahuje napríklad čierne korenie a paprika (5,7 a 5,1 mg/kg). Menej ako 0,2 mg/kg SA bolo zistené v cesnaku, zázvore a sušenej petržlenovej vňati.³²

4 Deriváty kyseliny salicylovej v ľudskom organizme

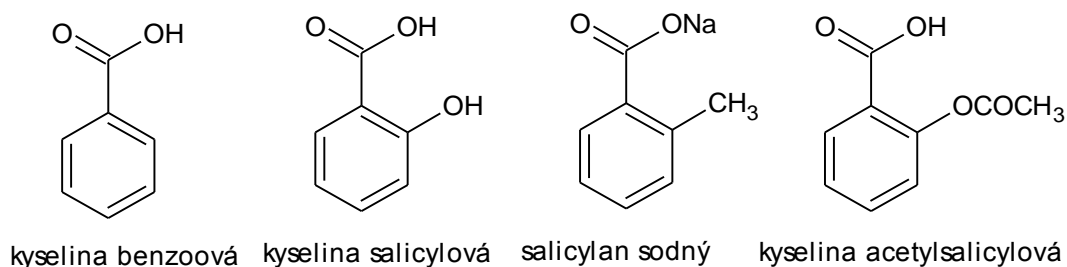
SA a jej deriváty sú účinné antipyretiká s miernymi analgetickými a protizápalovými účinkami. Použitie SA a jej derivátov v širšom rozmere umožnila až Kolbeho-Schmittová syntéza (r.1874) uvedená na obr.9. SA sa používa v dnešnej dobe v omedzenej miere, väčšinou vo forme solí (natriumsalicylát, lysinsalicylát, cholinsalicylát).³³

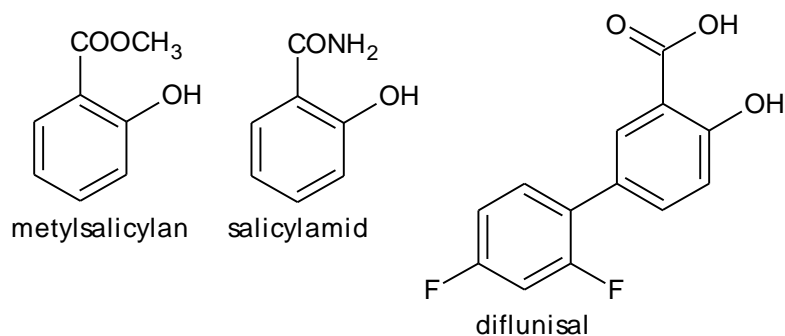


Obr.9 Kolbeho-Schmittova syntéza kyseliny salicylovej (prevzaté z literatúry 33).

4.1 Chemická štruktúra salicylanov

Základom štruktúry salicylanov je kyselina orto-hydroxybenzoová-kyselina salicylová. Deriváty kyseliny salicylovej možno rozdeliť na estery získané substitúciou karboxylovej skupiny (napríklad metylsalicylan), estery získané substitúciou hydroxylovej skupiny (napr. kyselina acetylsalicylová) a soli kyseliny salicylovej (napr. salicylan sodný). Substitúciou na karboxylovej alebo hydroxylovej skupine sa mení iba účinnosť, toxicita alebo tolerancia látky. Hydroxylové skupiny v polohe orto sú dôležité z hľadiska účinku, pretože kyselina benzoová má účinky oveľa slabšie.⁵ (viac obr.10).





Obr.10 Chemická štruktúra salicylanov (prevziaté z literatúry 5)

4.2 Vstrebávanie salicylanov

Perorálne podané salicylany sa vstrebávajú rýchlo, čiastočne zo žalúdka, no zväčša z duodena. Kyselina acetylsalicylová sa resorbuje nerozložená. Rýchlosť a rozsah vstrebávania závisí od rýchlosti vyprázdňovania žalúdka, rozkladu podanej liekovej formy a fyzikálno-chemických vlastností liečiva. Vstrebávanie salicylanov prebieha pasívnou difúziou nedisociovaných liposolubilných molekúl cez membrány buniek sliznice tráviacej sústavy. Ak je pH obsahu v lumene zvýšené, salicylany sa viacej ionyzujú, a preto pomalšie vstrebávajú, pri znížení pH je to naopak.⁵

4.3 Distribúcia salicylanov

Po vstrebaní sa salicylany rýchlo distribuujú do všetkých tkanív väčšiny tekutín organizmu, a to najmä pasívnymi procesmi. Môžeme ich detegovať v slzách, materskom mlieku i mozgomiechovom moku, ďalej tiež v peritoneálnej a synoviálnej tekutine. Stopy salicylanov nájdeme tiež v žlči, pote a stolici. Salicylany sa akumulujú v častiach orgánov s nižším pH (tzv. kyslé kompartmenty), teda aj v zápalových ložiskách, obličkách a v žalúdku, vyskytujú sa tiež vo výpotku reumatických kĺbov.⁵ Akumulácia salicylanov v bunkách sliznice žalúdka je veľmi dôležitá z hľadiska nežiaducich účinkov. Molekuly prechádzajú do buniek nedisociované, pri intracelulárnom pH 7,0 sa disociujú a nemôžu preniknúť späť do

extracelulárneho priestoru. Takto vzniká mnohonásobne, 15-20krát vyššia koncentrácia salicylanov v bunkách sliznice oproti lumenú žalúdku.⁵

4.4 Biotransformácia salicylanov

Biotransformácia salicylanov prebieha v mnohých tkanivách, no predovšetkým v mikrozómovom systéme a mitochondriách pečene. Produktmi biotransformácie sú tri produkty, a to kyselina salicyluronová (konjugát kyseliny salicylovej s glicínom), ester fenolglukuronid a ester acylglukuronid. Malá časť sa hydrolyzuje na kyselinu gentizovú, kyselinu 2,3-dihydroxybenzoovú a kyselinu 2,3,5-trihydroxybenzoovú. Tieto metabolity sa nachádzajú v moči, kým konjugáty a kyseliny gentizová aj v plazme, pečeni a niektorých ďalších tkanivách. Ak sú obličky funkčné a nepoškodené, metabolity sa vylučujú tak rýchlo, ako sa tvoria.⁵ Pozri obr. 4.

4.5 Vylučovanie salicylanov

Salicylany sa vylučujú najmä obličkami a v menších množstvách aj inými cestami. Pomer jednotlivých biotransformovaných zložiek sa veľmi mení v zdraví i chorobe. U človeka sa vylučuje voľná kyselina salicylová (10%), kyseliny salicylurová (75%), fenolglukuronid (5%) a kyselina gentizová (1%).⁵

4.6 Účinky salicylanov na ľudský organizmus

Fenolické látky sú veľmi dôležité nie len pre rastlinu, či už ako ochrana proti H_2O_2 alebo voľným radikálom, ale aj pre človeka. Nie len rastlinná bunka je schopná vyrábať H_2O_2 a je napádaná voľnými radikálmi, stretávame sa s týmito skutočnosťami aj u živočíchov a ľudského organizmu. Flavonoidné látky vo vzťahu k ľudskému zdraviu sú schopné: inhibovať enzýmy, inhibovať oxidáciu LDL cholesterolu (a tak pôsobiť ako prevencia

kardiovaskulárneho ochorenia), majú protizápalovú aktivitu, estrogénnu aktivitu a významnú antikancerogénnu aktivitu.³⁴

Účinky derivátov kyseliny salicylovej na funkcie ľudského organizmu, či už je človek chorý alebo zdravý sú mnohostranné a komplexné.

Analgetický účinok – salicylany sú jedny z najpoužívanejších analgetík. V porovnaní s narkotickými analgetikami morfinového charakteru nemajú na bolesť tak silný tlmiaci účinok, a preto sú používané pri bolestiach miernejšej intenzity, najmä pri bolesti hlavy, zubov, kĺbov a svalov. V takýchto prípadoch je účinok 650 mg kyseliny acetylsalicylovej najsilnejší asi o dve hodiny a trvá vyše štyroch hodín.⁵

Antipyretický účinok – salicylany sa vyznačujú rýchlym antipyretickým účinkom iba v prípade zvýšenej teploty tela alebo horúčkových stavoch. Normálnu teplotu tela znižujú len málo. V organizme udržuje stálu teplotu tela hypotalamus. V horúčkových stavoch a pri zvýšenej teplote tela spôsobujú salicylany „nastavenie termostatu” na normálnu teplotu.⁵

Účinok na zápalové a imunitné procesy – účinok salicylanov spočíva v potlačení klinických príznakov a pri zlepšovaní patologickoanatomických nálezov pri reumatickej horúčke. Niekedy ich zaraďujeme k symptomatickým liečivám, pretože neovplyvňujú komplikácie ochorenia.⁵

Účinok na metabolizmus – účinok salicylanov na metabolizmus cukrov je komplexný. Vysoké dávky salicylanov zvyšujú aeróbny metabolizmus glukózy a tiež zvyšujú aktivitu glukózo-6-fosfatázy. Naopak u diabetikov môžu znižovať glykémiu a zvyšovať toleranciu glukózy. Tento účinok spôsobuje pravdepodobne zvýšená utilizácia glukózy a jej znížená syntéza následkom útlmu základných enzýmov glukoneogenézy. Salicylany spôsobujú tiež zvyšovanie koncentrácie inzulínu v plazme. Salicylany ovplyvňujú tiež metabolizmus tukov, a to čiastočnou blokádou inkorporácie acetátu do mastných kyselín (ďalej MK) a ďalej inhibíciou adrenalinovej lipolýzy v tukových bunkách. Vyššie MK naviazané na plazmatické bielkoviny sa uvoľňujú. Spojením týchto účinkov sa zvyšuje prenikanie MK do hepatocytov, myocytov a do buniek ďalších tkanív, kde sa oxidujú. Koncentrácia plazmatických voľných MK, fosfolipidov a cholesterolu sa znižuje.⁵

Účinok na acydobázickú rovnováhu – salicylany vyvolávajú určité zmeny acidobázickej rovnováhy a elektrolytov už v bežných terapeutických dávkach. Jednou z reakcií na vyššie terapeutické dávky je intracelulárna a extracelulárna respiračná alkalóza. To je však rýchlo

kompenzované zvýšenou hladinou bikarbonátov spolu s draslíkom a sodíkom, takže pH krvi sa vracia k norme.⁵

Účinnok na tráviacu sústavu – kyselina acetylsalicylová narušuje ochrannú bariéru sliznice žalúdka v prítomnosti HCl, čo sa prejaví preniknutím vodíkových iónov z lúmenu do sliznice, sodíkových iónov zo sliznice do lúmenu a poklesom transmukózneho a elektrického potenciálu. Zvyšuje sa exfoliácia buniek sliznice. Výsledkom tohto stavu môže byť hemorágia alebo okultné krvácanie.⁵

Účinnok na obehovú sústavu – salicylany podporujú činnosť srdca a zvyšujú tlak v pravej komore i systémový tlak väčšinou kontrakčnou silou myokardu. Prekrvenie kože a akrálnych častí organizmu má dôležitú úlohu pri regulácii telesnej teploty. Antipyretický účinok terapeutických dávok salicylanov sa uskutočňuje predovšetkým zvýšeným prietokom krvi kožou, čím sa stráca teplo jednak žiarením a jednak vedením.⁵

5 Využitie derivátov kyseliny salicylovej v modernej medicíne

Látky nazývané analgetiká – antipyretiká (salicylany a paracetamol) majú schopnosť znižovať telesnú teplotu v horúčkových stavoch. Analgetický a antipyretický účinok spočíva v inhibícii syntézy prostaglandinov mechanizmom blokády kľúčového enzýmu tejto syntézy – cyklooxygenázy. Salicylany zaradíme do širokej skupiny nesteroidných protizápalových liečiv (NSAID) alebo tiež nesteroidných antireumatík, kde patria rovnakým mechanizmom účinku, ich indikácie sa však odlišujú. Naopak z nesteroidných antireumatík sa ako analgetikum často používa ibuprofen a diclofenac.

Ako nesteroidné antiflogistiká sa označujú liečivá charakterizované po chemickej stránke napojením karboxylovej skupiny na aromatické jadro. Z hľadiska pôsobenia ich charakterizuje inhibícia cyklooxygenázy (COX), týmto mechanizmom tlmí zápalové pochody, mierni bolesť a znižuje horúčku. Cyklooxygenázy sú enzýmy lokalizované na endoplazmatickom retikule, ktoré tvoria z kyseliny arachidonovej lokálne mediátory, prostaglandíny, prostacyklíny a tromboxány. Nesteroidné antiflogistiká pôsobia ako reverzibilné (s výnimkou kyseliny acetylsalicylovej) inhibítory cyklooxygenáz. Tieto enzýmy v molekule obsahujú dlhý pór (kanál), do ktorého sa kyselina arachidonová zasunie a kde sa

premení na účinnú látku. Antiflogistiká do tohto póru vniknú, naviažu sa na väzbové miesto, čím ireverzibilne inhibujú enzým.³⁵

Najpoužívanejším salicylanom v dnešnej medicíne je kyselina acetylsalicylová (acidum acetylsalicylicum), ktorá je vhodná k tlmeniu akútnej a subakútnej bolesti rôznej etiológie. Využívajú sa najmä ich vlastnosti antiagregačné, antipyretické a protizápalové. Kyselina salicylová (acidum salicylicum) a jej neacetylované deriváty nemajú na rozdiel od kyseliny acetylsalicylovej klinicky významné antiagregačné vlastnosti, a preto nezvyšujú riziko krvácanosti.

Acetylácia kyseliny salicylovej značne znižuje jej nepriaznivé pôsobenie na sliznice. Po resorpcii sa acetát odštepí (s polčasom 15-20 minút), takže potom in vivo zostáva kyselina salicylová. Dávkovanie kyseliny acetylsalicylovej ako antiflogistika je vyššie ako 3g denne. K terapii bežných bolestí sa používa dávka cca 500 mg. V malých dávkach (100-200 mg denne) sa po resorpcii v portálnom obehu dlhodobo vyradí syntéza tromboxanu v trombocytoch, sprostredkovaná cyklooxygenázou trombocytov, pretože kyselina acetylsalicylová tento enzým ireverzibilne inhibovala. Trombocyty nemajú možnosť syntetizovať COX de novo, pretože neobsahujú jadro. Kyselina acetylsalicylová môže vyvolať nežiadúce účinky, ktoré musíme mať na zreteli. Dráždi, žalúdočnú sliznicu, u predisponovaných pacientov môže vyvolať astmatický záchvat.³⁵

6 Interakcie používaných salicylanov v ľudskom organizme s vybranými liečivami

Interakcie salicylátov s rôznymi liekmi v ľudskom organizme môžeme rozdeliť na interakcie: farmakodynamické a farmakokinetické. Farmakokinetické interakcie vznikajú v dôsledku niektorých farmakokinetických vlastností salicylanov, čo môže byť napríklad väzba na plazmatické bielkoviny. Farmakodynamické interakcie vyplývajú z mechanizmu účinku salicylanov najmä z ich antiagregačného účinku a vplyvu na syntézu prostaglandínov.³⁶

Antikoagulancia, antiagregancia a trombolýtika: je známy dvojaký mechanizmus, ktorým salicylany znižujú krvnú zrážanlivosť. Vo vysokých dávkach (6g denne na 70kg telesnej hmotnosti) má kyselina acetylsalicylová priamy hypoprotrombinový účinok mechanizmom

inhibície syntézy vitamín K dependentných kolagulačných faktorov (II, VII, IX a X) už v nižších dávkach (75-100mg) pôsobí kyselina acetylsalicylová ireverzibilnú acetyláciu doštičkovej cyklooxygenázy (poškodzuje tak doštičkové funkcie na dobu 7 až 10 dní), čo je podstatou jej široko liečebne využívaného antiagregačného účinku.³⁶

Salicylany podnecujú účinok antikolagulancií, antiagregancií a trombolýtik. Tejto farmakodynamickej liekovej interakcie sa využíva v prevencii liečbe ICHS a všeobecne trombofilných stavov. Na druhej strane je táto interakcia spojená s vyšším rizikom a krvácajúcich komplikácií, predovšetkým v oblasti gastrointestinálneho traktu. Pacienti liečení NSAID majú 3-4 krát vyššie riziko vzniku krvácania z hornej časti GIT.³⁶ V prípade perorálnych antikolagulancií (warfarin, ethybis-kumecetat) existuje vedľa farmakodynamickej potenciácie účinkov tiež vzájomné ovplyvnenie na úrovni farmakokinetiky. Ako salicyláty, tak aj perorálne antikolagulancia sú vysoko viazané na bielkoviny krvnej plazmy a vzájomne sa z tejto väzby vytesňujú. Klinický dopad tejto interakcie je však kompenzovaný zvýšeným clearance neviazanej frakcie kumarínového derivátu, a preto sú ohrození len pacienti so zníženou schopnosťou eliminácie antikolagulancia (pacienti so zníženou funkciou pečene alebo srdčným zlyhaním).³⁶ Vo vyšších dávkach (2-4 g denne) zosilňuje kyselina acetylsalicylová antikoagulačný účinok warfarínu a v závislosti na dávke zvyšuje riziko krvácania, predovšetkým z GIT. V prípade súčasného podávania perorálnych antikoagulancií kyseliny acetylsalicylovej (2-4g denne) je vhodné znížiť dávkovanie antikoagulancia asi o 30%, alebo nahradiť kyselinu acetylsalicylovú paracetamolom. Nebezpečie zvýšenej krvácajivosti sa vzťahuje tiež na lokálne formy salicylátov.³⁶

Klinickými štúdiami bolo dokázané, že pridaním kyseliny acetylsalicylovej k trombolýtickej liečbe vedie k poklesu mortality pacientov s akútnym infarktom myokardu pri nezvýšenom riziku krvácania do CNS.³⁶

NSAID: všeobecnou vlastnosťou všetkých liečiv zo skupiny nesteroidných antiflogistík je nebezpečie gastrotoxicity v dôsledku postihnutia ochranných funkcií prostaglandinov v žalúdočnej sliznici. Preto je možné tvrdiť, že pri súčasnom užívaní dvoch liečiv tejto liekovej skupiny sa riziko sčíta. Situácia je zložitejšia tým, že gastrotoxický potenciál jednotlivých nesteroidných antiflogistík sa líši (napr. v prípade indometacinu a kyseliny acetylsalicylovej je vyšší ako u ibuprofenu). Je vhodné vyvarovať sa kombinácii týchto liečiv,

alebo voliť liečivá s nízkou gastrotoxicitou (paracetamol, ibuprofen). Upozorneniu sa vymykajú lokálne liekové formy.³⁶

Bolo zistené, že kyselina acetylsalicylová znižuje plazmatické koncentrácie diclofenacu, ibuprofenu, fenoprofenu, flurbiprofenu, ketoprofenu, naproxenu, tenoxicamu a tolmetinu, ale nemá vplyv na piroxicam. Rozporuplné údaje sa týkajú vzájomného ovplyvnenia kyseliny acetylsalicylovej a indometacinu, keď výsledky rôznych štúdií naznačujú zvýšené, znížené aj neovplyvnené koncentrácie, indometacinu. Príčiny popísaného farmakokinetického ovplyvnenia nie sú úplne vyjasnené, predpokladá sa interakcia na úrovni absorpcie väzby na plazmatické bielkoviny alebo renálnej exkrécie.³⁶

Furosemid: kyselina acetylsalicylová a furosemid vzájomne súperia o miesto v sekrečnom mechanizme proximálneho tubulu ľadvín. Preto pri súčasnom podávaní furosemidu a vyšších dávok kyseliny acetylsalicylovej (viac než 650mg denne) dochádza k zníženej eliminácii obidvoch liečiv. To má za následok pokles účinnosti furosemidu, ktorý má svoje miesto pôsobenia na luminálnej strane buniek proximálneho tubulu, a naopak nárast účinnosti salicylanov v dôsledku vzostupu jeho plazmatickej koncentrácie.³⁶

Spironolacton: Napriek tomu, že v štúdií so zdravými dobrovoľníkmi bolo zistené, že kyselina acetylsalicylová znižuje natriuretickú účinnosť spironolactonu na 70% vychádzajúcej aktivity, nebolo dokázané zníženie jeho antihypertenzného účinku u pacientov trpiacich hypertenziou. Zatiaľ nepanuje zhoda o presnom mechanizme tejto interakcie, medzi možné vysvetlenie patrí inhibícia renálnej produkcie prostaglandinov alebo inhibícia tubulárnej sekrécie hlavného účinného metabolitu spironolactonu.³⁶

Glycerol trinitrát: analgetické dávky kyseliny acetylsalicylovej zvyšujú plazmatické koncentrácie glycerol trinitrátu, čím podnecujú jeho farmakodynamické účinky vrátane nežiadúcich reakcií (hypotenzia, bolesti hlavy). Navrhnutým mechanizmom tejto liekovej interakcie je inhibícia eliminácie glycerol trinitrátu v dôsledku zníženého prietoku pečeňou spôsobeného kyselinou acetylsalicylovou. Je zaujímavé, že pri dlhodobom užívaní kyseliny acetylsalicylovej je situácia opačná, dochádza k potlačeniu vazodilatačných účinkov glycerol trinitrátu. Pre tento jav zatiaľ neexistuje uspokojujúce vysvetlenie. Je naopak isté, že obidve liečivá majú doplnkový antiagregačný účinok (kyselina acetylsalicylová blokádu tvorby tromboxanu a glycerol trinitrát zvýšením syntézy cyklického guanosinmonofosfátu).³⁶

Alkohol: Pri súčasnom požití alkoholu a salicylanov dochádza k súčtu ich škodlivého vplyvu na žalúdočnú sliznicu. Alkohol navyše podnecuje protizrážanlivé účinky kyseliny acetylsalicylovej, čím naďalej vzrastá riziko gastrointestinálneho krvácania. Kyselina acetylsalicylová inhibuje degradáciu etanolu pôsobením enzýmu alkoholdehydrogenázy v črevnej sliznici, a zvyšuje tak vstrebávanie v tenkom čreve.³⁶

Strava: Užitie salicylanov spoločne s potravou znižuje rýchlosť a rozsah absorpcie zo žalúdka a tenkého čreva. Príčinou zníženej absorpčnej kapacity je pravdepodobne absorpcia salicylanov na zložky potravy a zároveň spomalenie vyprázdňovania žalúdka. Ak je cieľom podania salicylanov rýchla úľava od bolesti, je vhodné podanie nalačno, naopak pri dlhodobej liečbe prospieva strava k ochrane žalúdočnej sliznice.³⁶

Popísané liekové interakcie salicylanov nie sú vyčerpávajúcim prehľadom všetkých zistených liekových interakcií, ale iba tých ktoré majú klinický význam, pretože bezprostredne ohrozujú pacienta a zároveň boli dostatočne doložené klinickými štúdiami.³⁶

Vedľa široko liečebne využívanej farmakodynamickej interakcie salicylanov a iných liečiv znižujúcich krvnú zrážanlivosť, existujú tiež farmakokinetické interakcie, ktoré nie sú primárne nežiadúce a majú liečebné využitie. Bolo zistené, že kofeín zvyšuje biologickú dostupnosť kyseliny acetylsalicylovej o 36% . Táto vlastnosť je využívaná v analgetických kombináciách. Známym je vplyv aktívneho uhlia (carbo activatus) na absorpciu mnoho liečiv a týka sa tiež salicylátov, ich biologická dostupnosť je súčasným podaním aktívneho uhlia znížená o 70%.³⁶

Salicylany patria v dnešnej dobe k najpoužívanejším liečivám. Ich prípravky sú väčšinou voľne predajné lieky. Tým rastie riziko výskytu nežiaducich, či život ohrozujúcich liekových interakcií, o ktorých by mal byť pacient informovaný svojim lekárom alebo lekárnikom. Zatiaľ čo niektoré uvedené liekové interakcie môžu zmariť liečebný zámer, iné predovšetkým spomenuté kombinácie s antikoagulanciami, znamenajú pre pacienta bezprostredné ohrozenie života.³⁶

7 Extrakcia a chemické analýzy

7.1 Extrakcia

Extrakcia je separačný (deliaci) proces, pri ktorom sú v kontakte dve vzájomne nemiesiteľné fáze. Látky (analyty) sa rozdeľujú medzi tie to fáze na základe rôznej rozpustnosti (rozdielných rozdeľovacích koeficientoch) v použitých rozpúšťadlách. Čím väčší je rozdiel medzi rozdeľovacími koeficientmi látok, tým dokonalejšie je ich oddelenie. Cieľom extrakcie je selektívne až špecifické oddelenie analytu od ostatných zložiek alebo naopak oddelenie rušiacich látok od analytu. Proces extrakcie môžeme rozdeliť do troch po sebe idúcich krokov:

1. vytvorenie extrahovateľnej formy sledovanej látky – úprava vzorky
2. zriadenie rozdeľovacej rovnováhy – vlastná extrakcia
3. prípadná izolácia stanovovanej látky z organickej fáze – reextrakcia, odparenie rozpúšťadla

Organické látky môžeme priamo extrahovať do vhodne zvoleného rozpúšťadla. Polarita rozpúšťadla musí približne odpovedať polarite extrahovanej látky. Vhodné rozpúšťadlo pre extrakciu polárnych organických látok je často miesiteľné s vodou (miesiteľnosť rastie s rastúcou polaritou rozpúšťadla), čo znemožňuje proces extrakcie. Organickú polárnu látku je teda nutné previesť do lepšie extrahovateľnej formy. K tomu sa môžu použiť:

- a. vedľajšie asociačné reakcie (dimerizácia, polymerizácia) a disociačné reakcie
- b. chemické reakcie³⁷

7.2 Chemické analýzy kyseliny salicylovej

Obsahy salicylanov v rastlinnom materiály sa líšia. Rozdiely vznikajú predovšetkým v pôvode salicylanov, napríklad ak sa jedná o detekciu čerstvého, spracovaného alebo už dlhšie skladovaného rastlinného materiálu. Dôležitá je tiež voľba analytickej metódy. V tomto

smere je plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (GS – MS), citlivejšia ako napríklad vysokotlaková kvapalinová chromatografia (HPLC) alebo detekcia podľa UV žiarenia.³²

Pri štúdiu na overovanie biologickej aktivity fenolických látok, vplyvov pôdnych a biotických faktorov k pochopeniu účinkov a interakcii fenolických zlúčenín v ekosystémoch bola popísaná vhodnosť extrakčných techník ako sú extrakcia pevnou fázou a extrakcia tekutinou v nadkritickom stave (SPE) pre izoláciu fenolických zlúčenín. Nástup spojených techník, medzi ktoré patrí LC/MS, LC/MS/MS, CE/MS a LC/NMR v spojení s HPLC/UV-VIS a CE/UV-VIS nám umožňujú presnú identifikáciu látok a poskytnúť informácie o štruktúre týchto biologicky aktívnych látkach.⁴²

Analýza fytohormónov je veľmi komplikovaná, pretože fytohormóny sa v rastlinnom materiáli vyskytujú len v stopovom množstve a navyše je potrebné vykonávať prácne čistiace procesy v mnohých krokoch. Platformou pre analýzu je plynová chromatografia spolu s hmotnostnou spektrometriou, kvôli vlastnostiam ako univerzalita, selektivita, senzitivita a bohaté predchádzajúce skúsenosti s analýzou fytohormónov.³⁸

Môže sa tiež použiť RIA (radioimunoanalýza) a ELISA založené na špecifických protilátkach. Nevýhodou sú nežiaduce interakcie so štruktúrne podobnými látkami.

Pre kvantifikáciu SA je možné použiť metódu HPLC s fluorescenčným detektorom. Touto metódou sa dosahuje dobrých výsledkov, ale je potrebné použiť komplexných purifikačných procesov k oddeleniu zložiek, ktoré nás zaujímajú, od obrovského množstva ostatných fluorescenčných zložiek z konkrétnej rastlinnej vzorky. Metóda GC/MS ponúka spoľahlivý spôsob separácie, identifikácie a kvantifikácie zložiek. Používa sa pre kvantifikáciu SA po derivatizácii polárnych skupín.

Ionizácia elektrónom dáva štruktúrne konfirmácie, ale detekčný limit a kvantifikácia môžu byť negatívne ovplyvnené zložkami, ktoré majú retenčný čas GC podobný hľadanej látke (SA).³⁹

V klinických a farmaceutických analýzach SA a jej derivátov sú preferované metódy, ktoré nevyžadujú úpravy vzoriek, ale umožňujú priamu analýzu v reálnom čase. Synchronná fluorescencia vďaka lepšej selektivite rozširuje praktickú využiteľnosť fluorescencie na analýzu mnohozložkových zmesí bez nutnosti riešenia problémov súvisiacich s úpravou vzoriek.⁴³

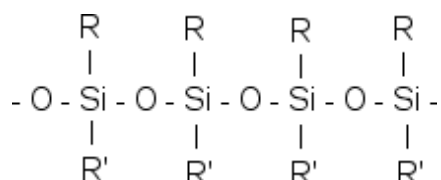
Užívanie kyseliny acetylsalicylovej bolo overované stanovením farmakokinetiky plazmatickej koncentrácie kyseliny salicylovej. Stanovenie prebiehalo na HPLC chromatografe s fluorescenčnou detekciou.⁴⁴

7.2.1 Plynová chromatografia GC

Vznik GC sa datuje rokom 1952, keď A. T. James a A. J. Martin publikovali delenie nižších mastných kyselín použitím plynu ako mobilnej fázy a kvapaliny ako stacionárnej fázy. Použitie plynovej chromatografie v chemickej analýze viedlo k značnému pokroku v mnohých oblastiach analytickej chémie a k zásadným zmenám v organickej analýze. Mnohé analýzy, ktoré sa pred tým nedali uskutočniť, alebo boli značne pracné, sa stali pomocou plynovej chromatografie bežnými. Pomocou GC možno získať úplnejšie informácie o kvalitatívnom zložení mnohozložkových zmesí. Plynovou chromatografiou možno analyzovať všetky plynné, kvapalné i tuhé látky, ktoré sú v chromatografických podmienkach prchavé a stabilné, ako i látky, ktoré možno chemickými premenami na takéto upraviť.⁴⁰

V plynovej chromatografii sa analyzovaná látka rozdeľuje medzi fázu stacionárnu a mobilnú. Mobilnou fázou je plyn. Stacionárnou fázou je kvapalina alebo povrchovo aktívny sorbent podľa čoho rozlišujeme chromatografiu plyn – kvapalina alebo plyn – tuhá látka. V chromatografii plyn – kvapalina je stacionárna fáza zakotvená ako tenká vrstva na inertnom nosiči dostatočne veľkého povrchu, čím sa dosahuje vhodný kontakt s mobilnou fázou. Nosný plyn je nízkoviskózna stlačiteľná tekutina v ktorej difúzne koeficienty analytov sú vysoké a interakcie medzi molekulami veľmi malé, takže takúto mobilnú fázu možno považovať za ideálny plyn. Prúdenie nosného plynu sa zabezpečuje tlakovým spádom v chromatografickej kolóne, v dôsledku ktorého rýchlosť toku nosného plynu pozdĺž kolóny vzrastá a na konci kolóny je najväčšia. Delené zložky musia byť dostatočne sorbované v stacionárnej fáze, ako aj dostatočne prchavé pri teplote kolóny, aby mohli byť cez separačný systém v plynnom stave transportované nosným plynom. Malá vzorka spravidla rozpustená v prchavom rozpúšťadle sa jednorázovo dávkuje ako úzka zóna cez odparovač vzorky do prúdu nosného plynu, ktorý ju unáša do kolóny. V kolóne sa zložky zmesi rozdielne sorbujú stacionárnou fázou a v dôsledku trvalého toku nosného plynu desorbujú. Tento proces sa opakuje, pričom nosný plyn unáša vzorku k výstupu z kolóny kde sa detekuje.⁴⁵

Kapilárna plynová chromatografia je najvýkonnejšia metóda na analýzu komplexných najmä mnohozložkových a izomérnych zmesí. Najvýznamnejšiu skupinu stacionárnych fáz predstavujú polysiloxány s rôznymi postrannými reťazcami. Všeobecná štruktúra fáz je na obr. 11.



Obr. 11 Štruktúra polysiloxanového reťazca (prevzaté z literatúry 45)

Kde R a R' sú rôzne substituenty. Príslušné polyméry (polysiloxány) sa pripravujú polykondenzáciou monomérneho silánderivátu. Zavedením rôznych substituentov ako metyl-, vinyl-, fenyľ-, kyanopropyl- alebo trifluorpropyl skupiny na kremíkový atóm sa menia separačné vlastnosti stacionárnych fáz v širokom rozmedzí. Stacionárne fázy radikálovo polymerizáciou zosieťujú v kolóne, čo zabezpečuje väčšiu stabilitu v kolóne ako aj možnosť čistenia kolóny premytím rotpúšťadlom.⁴⁵

II PRAKTICKÁ ČASŤ

1 Ciele výskumu

Hlavným cieľom bakalárskej práce je stanoviť množstvo kyseliny salicylovej v rôznych častiach rastliny vrbu bielej (*Salix alba*). Ďalším cieľom je porovnať zistené výsledky vzoriek.

2 Materiál a metodika

2.1 Odber vzoriek

Rastlinný materiál používaný pri analýze, bol odoberaný zo stromu vrbu bielej (*Salix alba*), rastúci v povodí rieky Moravy v Olomouci. Jednotlivé vzorky boli odobraté z rôznych častí rastliny. Pre analýzu bola použitá stará, odumretá kôra z kmeňa stromu, čerstvá kôra z kmeňa stromu, kôra z koreňa, ďalej kôra z mladých výhonkov, a to jednoročných, dvojročných a trojročných, tiež boli odobraté púčiky a listy rastliny. Vzorky boli odobraté v dvoch fázach, prvá v jesenných mesiacoch roku 2011 a druhá v jarných mesiacoch roku 2012. Z prvej fázy boli vzorky spracovávané sušením a z druhej fázy boli pre analýzu použité vzorky sušené aj čerstvé. Vzorky nazbierané v prvej fázy boli odobraté zo všetkých uvedených častí rastliny a v druhej fázy odberu boli odobraté vzorky kôry z mladých výhonkov, jednoročných, dvojročných a trojročných.

2.2 Chemikálie

methanol p. a. , Lach – Ner, ČR

síran sodný, Lach – Ner, ČR

BSTFA (N,O-bis(trimetylsilyl) trifluoroacetamid) p. a. , Fluka, Švajčiarsko

kyselina salicylová p.a. , Fluka, Švajčiarsko

hexan p. a. , Lach – Ner, ČR

pyridin p. a. , Lach – Ner, ČR

2.3 Prístrojové vybavenie

plynový chromatograf Agilent 7890A, Agilent Technologies, USA

hmotnostný spektrometer Agilent 5975C, Agilent Technologies, USA

nosný plyn – He 5.0. Siad, Taliansko

N₂, Messer, Nemecko

centrifuga Eppendorf 5702, USA

analytické váhy Mettler toledo, NewClassic MS205S, Švajčiarsko

ultrazvuková vaňa, Merci, ČR

2.4 Extrakcia kyseliny salicylovej z vŕby bielej (*Salix alba*)

500 mg vzorky sa zmiešalo v skúmavke s 3 ml metanolu, zmes sa krátku dobu pretrepala. V prípade čerstvých vzoriek sa použila polovičná navážka 0,250 g a prídavok 0,200 g bezvodého síranu sodného. Zmesi v skúmavkách sa nechali následne 20 minút premiešavať ultrazvukom a 5 minút centrifugovať pri 4000 ot/min. Roztok vzoriek bol dekantovaný a preliaty do vialiek a do sucha odparený dusíkom. Po odparení bolo ku vzorkám pridané 75 µl pyridínu a 75 µl silanizačného činidla BSTFA (N,O-bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid). Vialky boli zaviečkované a zahrievané na 90°C 40 minút. Potom boli vzorky nariedené do objemu 500 µl hexanom, následne zcentrifugované 5 minút na 4000 ot/min. Číry roztok bol použitý na analýzu plynovou chromatografiou.

2.5 Stanovenie kyseliny salicylovej pomocou GC/MS

Všetky merania boli vykonané na plynovom chromatografe Agilent 7890A s hmotnostným detektorom Agilent 5975C (Agilent Technologies, USA). K analýze bol dávkovaný 1 µl vzorky metódou pulzného dávkovania (140 kPa, 24 s) bez deliča toku. Teplota nástreku bola nastavená na 280°C. Ako nosný plyn bolo použité hélium s prietokom 0,9 ml/min. Separácia bola prevedená na kapilárnej kolone HP-5 ms o dĺžke 30 m, vnútorný priemer 0,25 mm a s hrúbkou filmu 0,25 µm s teplotným programom 50°C – 2 min – 10°C/min - 300°C – 15

min. Hmotnostný spektrometer využíval pozitívnu ionizáciu elektrónom (70 Ev). Hmotnostné spektrá boli snímané v rozsahu 29 – 520 m/z. Kvantitatívne hodnotenie bolo vykonané pre ión 267 m/z, pozri obr. 12, 13 a 14.

3 Výsledky a diskusia

Pri analýze kyseliny salicylovej v rastlinnom materiály boli vzorky odobraté z jednotlivých častí rastliny vrby bielej (*Salix alba*). Vzorky boli odobraté v dvoch časových obdobiach v jeseni a na jar. V jesenných mesiacoch boli analýze podrobené vzorky odobraté zo všetkých častí rastliny. Vzorky sa analyzovali pomocou plynovej chromatografie spojenou s hmotnostnou spektrometriou.

V prvej fáze odberu vzoriek bolo cieľom výskumu zistiť obsiahnuté množstvo kyseliny salicylovej v jednotlivých častiach rastliny. Najmenšie množstvo kyseliny salicylovej bolo obsiahnuté v kôre odobratej z kmeňa stromu a kôre odobratej z koreňovej časti, preto boli tieto vzorky pre ďalšiu analýzu nezaujímavé. Predpokladá sa, že hladina kyseliny salicylovej obsiahnutá v odumretej kôre sa nemení, pretože tu už nedochádza k žiadnym metabolickým pochodom. Z praktických dôvodov sa v druhej fáze analýzy vylúčili vzorky púčikov rastliny, pretože zber púčikov je zložitý.

V bežnej zažitej praxi sa k liečebným účelom zbiera kôra len z mladých výhonkov rastliny, odporúčaná doba zberu je v jarných mesiacoch, kedy je obsah účinných látok (SA) najvyšší.

V druhej fáze boli analyzované teda už len vzorky kôry z mladých výhonkov rastliny, jednoročných, dvojročných a trojročných.

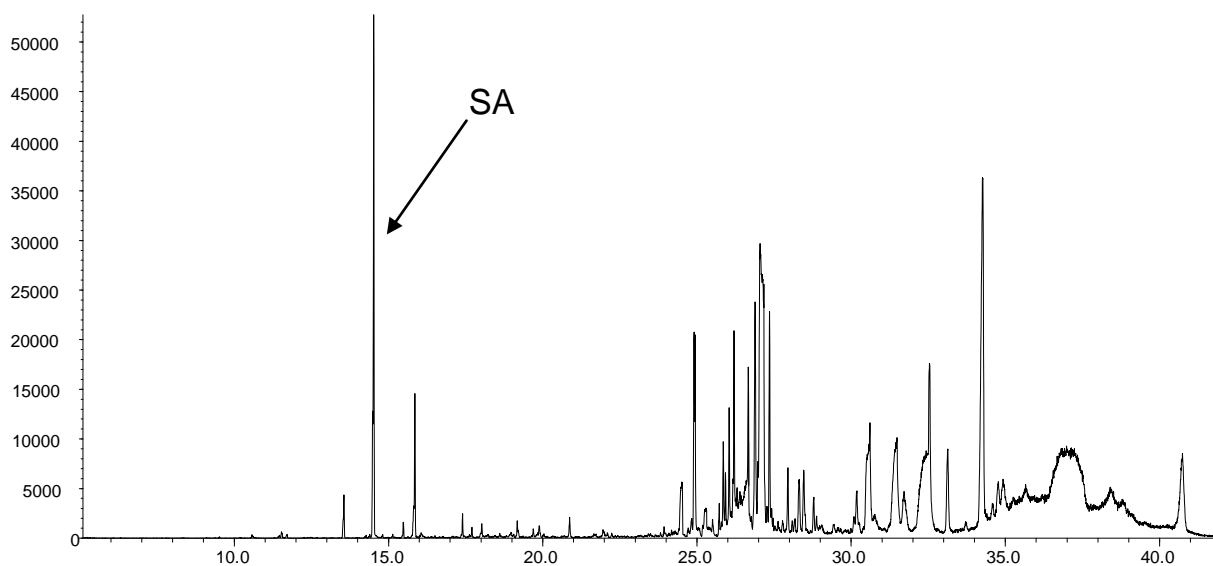
Predmetom záujmu bolo porovnať hladinu SA obsiahnutú ako v čerstvých, tak aj v sušených vzorkách. Vo vyššie uvádzaných štúdiách bolo dokázané, že obsah SA v rastlinnom materiály sa veľmi líši v čerstvom a akokoľvek spracovanom materiály. Nižší obsah SA v materiály spracovanom napr. sušením môže byť spôsobený tým, že v rastlinných pletivách dochádza ešte k ukončovaniu metabolických pochodom a priebehu niektorých biochemických reakcii, čomu podlieha zrejme aj kyselina salicylová. Hladina SA v nami analyzovaných vzorkách z čerstvého materiálu bola až niekoľkonásobne vyššia oproti obsahu SA vo vzorkách spracovaných sušením. Obsah SA v rastlinnom materiály taktiež závisí na období zberu. Vzorky odobraté v jesenných mesiacoch obsahujú podstatne nižšiu hladinu SA oproti

vzorkám z jarných mesiacov. V období jesene dochádza k značnému spomaľovaniu metabolických dejov, čo má za následok nižší obsah SA. Výsledky analýzy obsahu SA v suchých vzorkách boli vzťahnuté na 1 g sušenej vzorky a v čerstvých vzorkách na 1 g čerstvej vzorky, viac tabuľka 1.

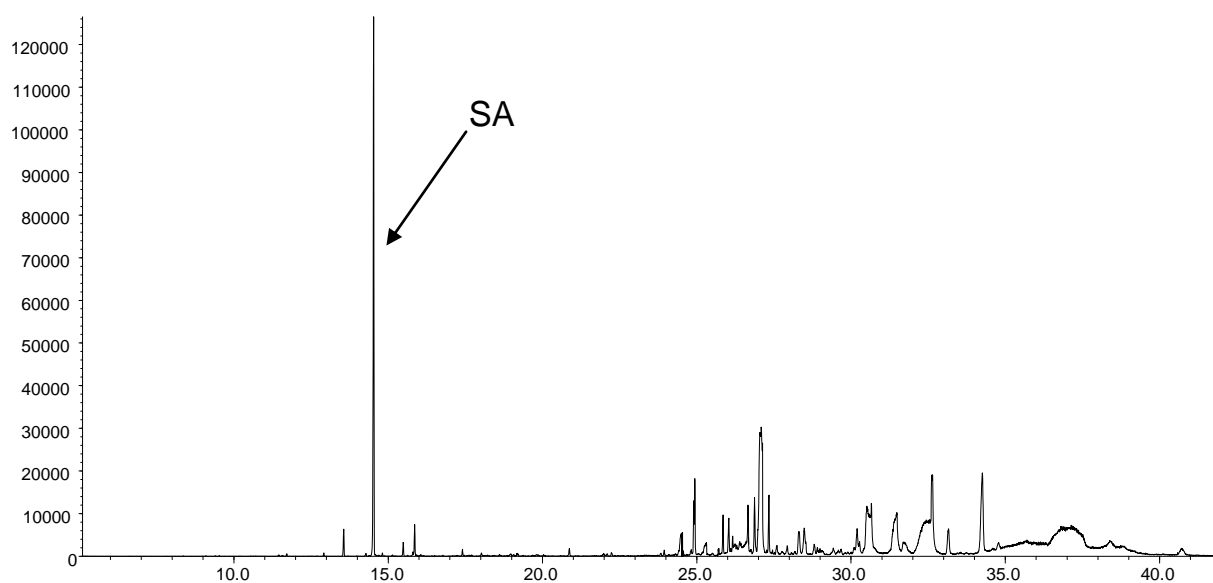
Tabuľka 1 Obsah SA analyzovaných vzoriek.

vzorka	obsah SA [$\mu\text{g/g}$]
jeseň - suché vzorky	
<i>odumretá kôra</i>	18,53
<i>kôra-kmeň stromu</i>	2,57
<i>kôra-koreň</i>	0,95
<i>púčiky</i>	27,46
<i>1-ročné výhonky</i>	39,66
<i>2-ročné výhonky</i>	26,45
<i>3-ročné výhonky</i>	41,18
jar - suché vzorky	
<i>1-ročné výhonky</i>	171,42
<i>2-ročné výhonky</i>	275,34
<i>3-ročné výhonky</i>	144,26
jar - čerstvé vzorky	
<i>1-ročné výhonky</i>	303,45
<i>2-ročné výhonky</i>	461,22
<i>3-ročné výhonky</i>	611,05

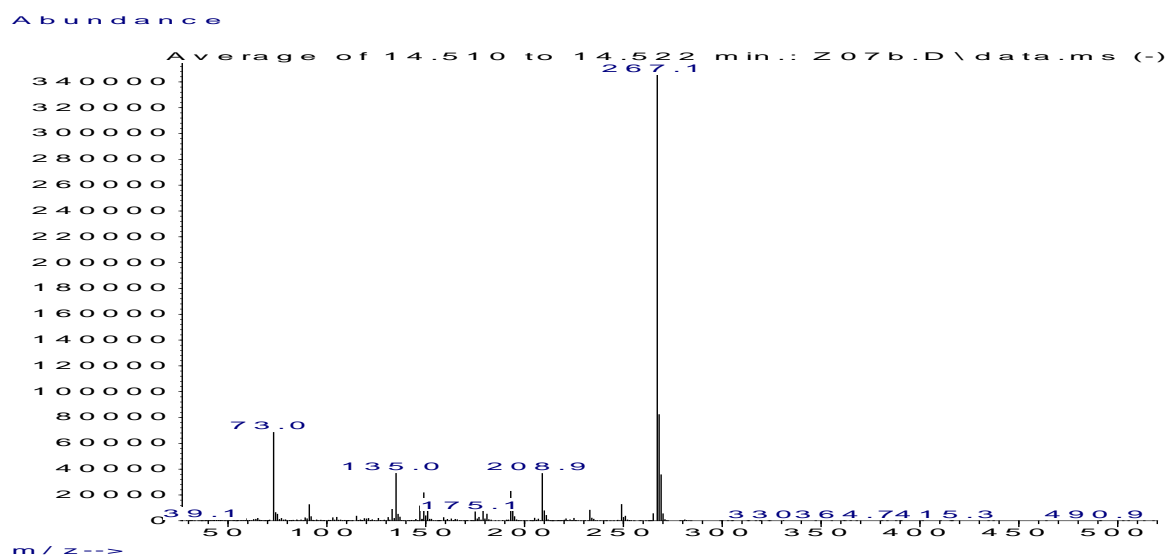
Kyselina salicylová je jedným z veľmi dôležitých fytohormónou, ktorý zohráva nepostrádateľnú úlohu pri kontrole rastu a v imunitnom systéme rastliny. Už v dávnych dobách bola vrbová kôra využívaná ako účinné analgetikum a antipyretikum, ale pre jej horkú chuť a neprijemné nežiaduce účinky sa hľadala látka s rovnakými liečivými účinkami bez nežiaducich reakcií. Objav kyseliny acetylsalicylovej (Aspirínu) bol v 19. storočí prevratným okamihom v medicíne. V dnešnej dobe existuje mnoho liečiv obsahujúcich kyselinu salicylovú alebo jej derivátov, ktoré sú nepostrádateľné a majú veľmi široké spektrum využitia.



Obr. 12 Chromatogram - jarné sušené vzorky - trojročné výhonky (rekonštruovaný iontový chromatogram pre ión 267 m/z).



Obr. 13 Chromatogram - jarné čerstvé vzorky - trojročné výhonky (rekonštruovaný iontový chromatogram pre ión 267 m/z).



Obr. 14 Hmotnostné spektrum kyseliny salicylovej.

4 Záver

Bakalárska práca sa zaoberá analýzou kyseliny salicylovej v rastlinnom materiály, konkrétne vrby bielej (*Salix alba*). Teoretická časť zahrňuje hlavnú úlohu kyseliny salicylovej v rastlinách, históriu objavu SA a jej najdôležitejšieho derivátu kyseliny acetylsalicylovej, ich účinkov na ľudský organizmus a využitie v modernej medicíne. V tejto časti sú ďalej popísané chemické extrakčné metódy a separačné analytické metódy. Praktická časť práce sa zameriava na stanovenie celkového obsahu kyseliny salicylovej v rastlinnom materiály pomocou plynovej chromatografie spojenou s hmotnostnou spektrometriou.

Stanovený obsah kyseliny salicylovej vo vzorkách nazbieraných v prvej fáze zberu (v jesenných mesiacoch): *odumretá kôra stromu* – 18,53 µg/g sušenej vzorky; *kôra z kmeňa stromu* – 2,57 µg/g sušenej vzorky; *kôra z koreňa* – 0,95 µg/g sušenej vzorky; *púčiky* – 27,46 µg/g sušenej vzorky; *jednoročné výhonky* – 39,66 µg/g sušenej vzorky; *dvojročné výhonky* – 26,45 µg/g sušenej vzorky; *trojročné výhonky* – 41,18 µg/g sušenej vzorky.

V druhej fáze zberu (v jarných mesiacoch) je obsah SA nasledujúci:

1. sušené vzorky: *jednoročné výhonky* – 171,42 µg/g sušenej vzorky; *dvojročné výhonky* – 275,34 µg/g sušenej vzorky; *trojročné výhonky* – 144,26 µg/g sušenej vzorky.
2. čerstvé vzorky: *jednoročné výhonky* – 303,45 µg/g čerstvej vzorky; *dvojročné výhonky* – 461,22 µg/g čerstvej vzorky; *trojročné výhonky* – 611,05 µg/g čerstvej vzorky.

Z prevedených experimentov vyplýva, že najvyššia hladina kyseliny salicylovej je obsiahnutá v čerstvom rastlinnom materiály a akýmkoľvek ďalším upravovaním vzorku, ako mrazením, varením, sušením sa obsah SA výrazne znižuje. Obsah SA závisí tiež na ročnom období zberu materiálu, v jeseni sú hladiny SA v rastlinách výrazne nízke oproti jarnému obdobiu.

Použitá literatúra:

1. Zdravie zo stromov. In: *Forest Portál: O lesoch Slovenska* [online]. 2008 [cit. 2012-04-18]. Dostupné z: http://www.forestportal.sk/forestportal/zdroj_poznania/zaujímavosti_les/zdravie_stromy/zdravie_stromy.html
2. Vrbu bielu nahradil aspirín. In: *Korzár* [online]. 22. 6. 2002 [cit. 2012-04-18]. Dostupné z: <http://korzar.sme.sk/c/4653431/vrbu-bielu-nahradil-aspirin.html>
3. CASTLEMAN, Michael. *Velká kniha léčivých rostlin: klasický průvodce nejlepšími přírodními léčivy představující ty nejlepší - časem i vědou prověřené - léčivé rostliny*. Překlad Jitka Černá. Praha: Columbus, 2004, 635 s. ISBN 80-724-9177-6.
4. Vřba biela / Vrba bílá. In: *Edusan: poradca pre zdravie od roku 1999* [online]. [cit. 2012-04-18]. Dostupné z: http://www.edusan.sk/dom_lek/byliny_zobr.php?id=44
5. GALANDA, Vladimír, Ján BUCHANEC, Peter VIŠŇOVSKÝ a Viera ROSSLEROVÁ. *Klinická farmakológia salicylanov u detí a mladistvých*. Martin: Osveta, 1991. ISBN 80-217-0355-5.
6. ASPIRIN – Eine unendliche Geschichte. In: *Didaktik der Chemie* [online]. 20. 9. 2010 [cit. 2012-04-18]. Dostupné z: <http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/aspirin/aspirin.htm>
7. Od Aspirínu k Viagre. In: SZOLCSÁNYI, Peter. *Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave* [online]. [cit. 2012-04-18]. Dostupné z: <http://www.chtf.stuba.sk/~szolcsanyi/education/files/Od%20Aspirinu%20k%20Viagre.pdf>
8. Aspirin C. [online]. [cit. 2012-04-18]. Dostupné z: <http://www.aspirin-c.sk/showdoc.do?docid=335>
9. LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004, 725 s. ISBN 80-247-0836-1.

10. Využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek. In: MARCANÍKOVÁ, Kateřina a Blanka BEŇOVÁ. *Chemické listy*[online]. 2010 [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_13_s27-s30.pdf
11. HESS, Dieter. *Fyziologie rostlin*. 1. vyd. Praha: Academia, 1983, 341 s.
12. LUŠTINEC, Jiří a Viktor ŽÁRSKÝ. *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 261 s. ISBN 80-246-0563-5.
13. Přírodní látky/Chemie přírodních látek/Přehled přírodních látek/Glykosidy. In: *Wikiknihy* [online]. 28. 10. 2011 [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: http://cs.wikibooks.org/wiki/Přírodní_látky/Chemie_přírodních_látek/Přehled_přírodních_látek/Glykosidy
14. HAMPL, František a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 413 s. ISBN 80-708-0495-5.
15. HAYAT, S a A AHMAD. *Salicylic acid: a plant hormone*. Dordrecht: Springer, c2007, 401 s. ISBN 14-020-5184-0.
16. Cvičení z fyziologie rostlin: Organogeneze in vitro. In: *Laboratory of Growth Regulators* [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: http://rustreg.upol.cz/vyuka/fyziologie_rostlin/FZRSB_Organogeneze_in_vitro.pdf
17. DURRANT, W.E. a X. DONG. SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology*[online]. 2004, roč. 42, č. 1, s. 185-209 [cit. 2012-04-19]. ISSN 0066-4286. DOI: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
18. KESSMANN, Helmut, Theo STAUB, Christina HOFMANN, Thomas MAETZKE, Jürg HERZOG, Eric WARD, Scott UKNES a John RYALS. Induction of Systemic Acquired Disease Resistance in Plants by Chemicals. *Annual Review of Phytopathology* [online]. 1994, roč. 32, č. 1, s. 439-459 [cit. 2012-04-19]. ISSN 0066-4286. DOI: 10.1146/annurev.py.32.090194.002255. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.32.090194.002255>
19. STINTZI, A., T. HEITZ a V. PRASAD. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. In: *PubMed* [online]. 1993 [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://generator.citace.com/dok/2cghYssn3eqt6mLx>

20. EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. In: *CiteULike* [online]. 2005 [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://www.citeulike.org/user/BioNica/article/3441103>
21. PAVLOVÁ, Libuše. *Fyziologie rostlin*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 253 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0985-1.
22. Kyselina acetylsalicylová. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_acetylsalicylov%C3%A1
23. NAVARRO, Lionel, Cyril ZIPFEL, Owen ROWLAND, Ingo KELLER, Silke ROBATZEK, Thomas BOLLER a Jonathan D.G. JONES. The Transcriptional Innate Immune Response to flg22. Interplay and Overlap with Avr Gene-Dependent Defense Responses and Bacterial Pathogenesis. *Plant physiology* [online]. 2004, June [cit. 2012-04-21]. ISSN 1532-2548. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/content/135/2/1113.full>
24. PIETERSE, Corné M J, Antonio LEON-REYES, Sjoerd VAN DER ENT a Saskia C M VAN WEES. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* [online]. 2009, roč. 5, č. 5, s. 308-316 [cit. 2012-04-21]. ISSN 1552-4450. DOI: 10.1038/nchembio.164. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nchembio.164>
25. MAUCH-MANI, B. Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance to Pathogen Attack. *Annals of Botany*. roč. 82, č. 5, s. 535-540. ISSN 03057364. DOI: 10.1006/anbo.1998.0726. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/doi/10.1006/anbo.1998.0726>
26. TAIZ, Lincoln a Eduardo ZEIGER. *Plant physiology*. 3rd ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, c2002, 690 s. ISBN 08-789-3823-0.
27. *Biochemistry: [edited by] Bob B. Buchanan, Wilhelm Grisse, Russell L. Jones*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000, 1367 s. ISBN 09-430-8839-9.
28. RYALS, J. A., NEUENSCHWANDER, U. H., WILLITS, M. G., MOLINA, A., STEINER, H. Y., HUNT, M. D. (1996): Systemic acquired resistance, *Plant Cell*, 8(10): 1809-1819.

29. YALPANI, N., LEON, J., LAWTON, M. A., RASKIN, I. (1993): Pathway of Salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated Tobacco, *Plant Physiology*, 103(2): 315-321.
30. MORGAN, G. Should Aspirin be Used to Counteract Salicylate Deficiency? *Pharmacology & Toxicology*, 2003, Vol. 93, p. 153-155.
31. KLIMEKOVÁ, Marta a Zuzana LEHOCKÁ. KVALITA V EKOLOGICKOM POĽNOHOSPODÁRSTVE - MÝTUS ALEBO REALITA ?. In: LEHOCKÁ, Zuzana. *Pôdohospodársky poradenský systém* [online]. [cit. 2012-04-21]. Dostupné z: http://www.agroporadenstvo.sk/ep/kvalita_ep.pdf
32. SCOTTER, Michael J., Dominic P.T. ROBERTS, Lesley A. WILSON, Frances A.C. HOWARD, June DAVIS a Nicholas MANSELL. Free salicylic acid and acetyl salicylic acid content of foods using gas chromatography–mass spectrometry. [online]. 2007 [cit. 2012-04-21]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607002233>
33. HAMPL, František a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 413 s. ISBN 80-708-0495-5.
34. *VLIV ABIOTICKÝCH A BIOTICKÝCH STRESORŮ NA VLASTNOSTI ROSTLIN* [online]. 2006 [cit. 2012-04-21]. ISBN 80 – 213 – 1484 - 2 (ČZU v Praze). Dostupné z: <http://www.vurv.cz/files/publications/isbn80-86555-85-2.pdf>
35. LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Lutz HEIN. *Barevný atlas farmakologie*. 3. vyd. Praha: Grada, 2007, 372 s. ISBN 978-80-247-1672-5
36. DOLEŽAL, Tomáš. Lékové interakce salicylátů. In: *MEDICINA: První český zdravotnický portál* [online]. 21.2.2002 [cit. 2012-04-21]. Dostupné z: http://nova.medicina.cz/odborne/clanek.dss?s_id=4119MEDICINA
37. Extrakce. In: *Univerzita Karlova v Praze: Přírodovědecká fakulta* [online]. [cit. 2012-04-21]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>
38. *Journal of Chromatography A* [online]. 2003, roč. 993, 1-2 [cit. 2012-04-18]. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730300356X>
39. ENGELBERTH, Juergen, Eric A. SCHMELZ, Hans T. ALBORN, Yasmin J-CARDOZA, Juan HUANG a James H. TUMLINSON. Simultaneous quantification of

- jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor-phase extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry. *Analytical biochemistry* [online]. 2003, roč. 312, č. 2, s. 9 [cit. 2012-04-18]. ISSN 312 (2003) 242-250. Dostupné z: databáze Web of Science
40. Plynová chromatografia ako analytická metóda a jej využitie. In: *Gymnázium Ludivíta Štúra vo Zvolene* [online]. [cit. 2012-04-21]. Dostupné z: <http://www.gymzv.sk/~prezentacie/provek/18/18.pdf>
41. □ADÁMKOVÁ, Š., L. LUHOVÁ, M. PETŘIVALSKÝ a P. PEČ. Role L-fenylalaninamoniumlyasy při obranné reakci rostlin. *Chem. Listy 100* [online]. 2006, s. 486-494 [cit. 2012-04-21]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_07_486-494.pdf
42. KLEJDUS, Bořivoj a Vlastimil KUBÁŇ. Rostlinné fenoly v allelopatii. *Che. Listy 93* [online]. 1999, 243 - 248 [cit. 2012-04-21]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_04_243-248.pdf
43. TÓTHOVÁ, Jana a Jana SÁDECKÁ. Princípy a využitie synchronnej fluorescence pri analýze mnohozložkových vzoriek. *Chem. Listy 104* [online]. 2010, 778–783 [cit. 2012-04-21]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_08_778-783.pdf
44. ALUŠÍK, Štefan, Věra JEDLIČKOVÁ, Zoltán PALUCH a Magdaléna LEJSKOVÁ. Stanovení plazmatických koncentrací kyseliny salicylové při ověřování spolupráce pacienta v léčbě kyselinou acetylsalicylovou. *Chem. Listy 104* [online]. 2010, s. 803-806 [cit. 2012-04-22]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_08_803-806.pdf
45. SOJÁK, L., M. HUTTA a M. ŽEMBÉRYOVÁ. Plynová chromatografia v enviromentálnej analýze. [online]. 2002 [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: http://www.fns.uniba.sk/uploads/media/GC_v_Environmentalnej_chemii_02.pdf

ZOZNAM SKRATIEK

CE	kapilárna elektroforéza
CNS	centrálny nervový systém
COX	cyklooxygenáza
GC	plynová chromatografia
GIT	gastrointestinálny trakt
HPLC	vysokotlaková kvapalinová chromatografia
ICHS	Ischemická choroba srdca
JA	kyselina jasmonová
LC	kvapalinová chromatografia
MS	hmotnostná spektrometria
NSAID	nesteroidné protizápalové liečivá
SA	kyselina salicylová
SAR	systémovo získaná rezistencia