

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie (FAPPZ)



Výskyt amygdalinu v potravinách a krmivech

Bakalářská práce

Autor práce je Kseniia Fadeeva

FAPPZ

Zemědělství, zahradnictví a rozvoj venkova

Kvalita produkce

Vedoucí práce je doc. Ing. Alena Hejtmánková, CSc.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Výskyt amygdalinu v potravinách a krmivech" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní doc. Ing. Aleně Hejtmánkové, CSc., panu Ing. Martinu Kulhánkovi, Ph.D., paní Ing. Kláře Podhorecké za neocenitelnou pomoc při psaní textu bakalářskou práci a při provádění laboratorního výzkumu. Chtěla bych také poděkovat za Vaši trpělivost, optimismus a podporu.

Výskyt amygdalinu v potravinách a krmivech

Souhrn

Bakalářská práce je věnována amygdalinu, zástupci kyanogenních glykosidů. Glykosidy jsou látky rostlinného původu. Skládají se ze dvou složek, cukru a necukerné části, tj.: aglykonu.

Kyanogenní glykosidy jsou glykosidy určitých kyanogenních aldehydů a ketonů. Rostliny obsahující kyanogenní glykosidy jsou v přírodě zcela běžné. Nacházejí se ve flóře téměř ve všech částech světa. Známé je kolem 75 kyanogenních glykosidů. Jsou to kyanogeny mnoha rostlin konzumovaných jako složky lidské potravy nebo používaných jako krmiva hospodářských zvířat. Jsou obsaženy ve dvouděložných rostlinách čeledi bobovitých (*Fabaceae*), pryšcovitých (*Euphorbiaceae*) a mučenkovitých (*Passifloraceae*) a v jednoděložných rostlinách čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) a áronovitých (*Araceae*).

Amygdalin se skládá z disacharidu genciobinózy a aglykonu mandelonitrilu, který při enzymatické nebo kyselé hydrolýze uvolňuje obdobně jako další kyanogenní glykosidy toxickou složku kyselinu kyanovodíkovou (HCN), což může způsobit poškození nervového systému, neboť kyanovodík je toxický pro všechny živé buňky. K těmto procesům může dojít během vaření nebo též během dlouhodobého skladování kyanogenních potravin či krmiv. Uvolnění kyanovodíku může nastat též pokud tkáň rostliny obsahující amygdalin, je poškozena například napadením býložravci.

Amygdalin je nejběžnějším kyanogenním glykosidem v České republice. Nachází se v rostlinách rodu slivoňovité (*Prunus*) z čeledi růžovité *Rosaceae*. Nachází se v ovoci, které je tradičně konzumováno lidmi, a také toto ovoce také slouží jako doplněk při krmení domácích zvířat. Významnými zdroji amygdalinu jsou hořké mandle a pecky meruněk, broskví, švestek a třešní. V peckách broskve je obsaženo 2,4 mg.g⁻¹ amygdalinu. Amygdalin byl nalezen též v jádrech švestky (4100 mg.100 g⁻¹), meruňky (2394 mg.100 g⁻¹) a třešní (2306 mg.100 g⁻¹). V sušině jader hořkých mandlí byly stanovené hladiny amygdalinu 5808 mg.100 g⁻¹ a v sušině jader sladkých mandlí 106 mg.100 g⁻¹, ale jsou známy také sladké odrůdy mandlí například Texas, v nichž amygdalin nebyl detekován.

Nejoblíbenějším ovocem v České republice je jablko. V malém množství je amygdalin obsažen také v jádrech jablek, hrušek a kdoulí. Jeho obsah v jablečných semenech se podle literárních údajů pohybuje od 1 do 4 mg.g⁻¹. V semenech jablek 4 odrůd vypěstovaných v Praze Suchdole bylo zjištěno 5,54 – 9,41 mg.g⁻¹ amygdalinu. Semena Luna měla nejvyšší obsah amygdalinu (7,67 mg.g⁻¹), nejnižší obsah vykazovala odrůda Golden Delicious (4,94 mg.g⁻¹).

Obsah amygdalinu v semenech ovocných stromů a rostlinách je ovlivněn vlastnostmi půdy. Bylo prokázáno, že obsah kyanogenních glykosidů roste v rostlinách s vysokou slaností půdy, v listech se syntetizují kyanogenní glykosidy a poté se transportují do jiných částí rostlin.

Na bázi amygdalinu je též doplněk stravy, nazývaný vitamin B₁₇, nebo také Laetril, kterému jsou někdy přisuzovány protinádorové účinky. Na základě analýzy současných studií

věnovaných tomuto tématu, však nelze dat jednoznačnou odpověď, zda amygdalin skutečně těmito vlastnostmi disponuje.

Klíčová slova: glykosid, kyselina kyanovodíková, amygdalin, sekundární metabolity, protirakovinový účinek, semena jablek

Occurrence of amygdalin in food and feed

Summary

The bachelor thesis is devoted to amygdalin, a representative of cyanogenic glycosides. Glycosides are substances of plant origin. They consist of two components, sugar and a non-sugar part, ie: aglycone.

Cyanogenic glycosides are glycosides of certain cyanogenic aldehydes and ketones. Plants containing cyanogenic glycosides are quite common in nature. They are found in flora in almost all parts of the world. About 75 cyanogenic glycosides are known. They are cyanogens of many plants consumed as components of human food or used as animal feed. They are contained in dicotyledonous plants of the families *Fabaceae*, *Euphorbiaceae* and *Passifloraceae* and in monocotyledonous plants of the family *Poaceae* and *Araceae*.

Amygdalin consists of the disaccharide genciobinose and the aglycone of mandelonitrile, which, like enzymatic or acid hydrolysis, releases the toxic component hydrocyanic acid (HCN), like other cyanogenic glycosides, which can cause damage to the nervous system, as hydrogen cyanide is toxic to all living cells. These processes can occur during cooking or during long-term storage of cyanogenic food or feed. The release of hydrogen cyanide can also occur if the tissue of the plant containing amygdalin is damaged, for example, by infestation by herbivores.

Amygdalin is the most common cyanogenic glycoside in the Czech Republic. It is found in plants of the genus *Prunus* from the family *Rosaceae*. It is found in fruits that are traditionally consumed by humans, and this fruit also serves as a supplement when feeding domestic animals. Significant sources of amygdalin are bitter almonds and stone apricots, peaches, plums and cherries. Peach seeds contain $2.4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of amygdalin. Amygdalin was also found in the kernels of plum ($4100 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), apricot ($2394 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) and cherries ($2306 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Amygdalin levels of $5808 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ have been determined in the dry matter of bitter almond kernels and $106 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ in the dry matter of sweet almond kernels, but sweet almond varieties such as Texas are also known, in which amygdalin has not been detected.

The most popular fruit in the Czech Republic is apple. Amygdalin is also found in small amounts in the kernels of apples, pears and quinces. According to literature data, its content in apple seeds ranges from 1 to $4 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. $5.54 - 9.41 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of amygdalin was found in apple seeds of 4 varieties grown in Prague Suchdol. Luna seeds had the highest content of amygdalin ($7.67 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), the lowest content was shown by the variety Golden Delicious ($4.94 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$).

The content of amygdalin in the seeds of fruit trees and plants is influenced by the properties of the soil. It has been shown that the content of cyanogenic glycosides increases in plants with high soil salinity, cyanogenic glycosides are synthesized in the leaves and then transported to other parts of the plants.

Amygdalin-based is also a dietary supplement called vitamin B₁₇, or Laetril, which is sometimes attributed with antitumor effects. However, based on the analysis of current studies

on this topic, it is not possible to give a clear answer as to whether amygdalin actually has these properties.

Key words: glycoside, hydrocyanic acid, amygdalin, secondary metabolites, anticancer effect, apple seeds

Obsah

1 Úvod	10
2 Cíl práce	11
3 Literární rešerše.....	12
3.1 Glykosidy jako sekundární metabolity rostlin	13
3.1.1 Sekundární metabolity, biologická aktivita a toxicita některých rostlinných látek.....	13
3.1.2 Charakteristika glykosidů	15
3.1.3 Reakce a změny glykosidů	16
3.1.4 Fenolové glykosidy	17
3.1.5 Flavonoidy	18
3.1.6 Antokyany	18
3.1.7 Antrachinonové glykosidy.....	19
3.1.8 Glukosinoláty.....	20
3.1.9 Kardioglykosidy.....	21
3.1.10 Saponiny	22
3.1.11 Glykosidy s iridoidovým aglykonem (Hořčiny).....	23
3.2 Kyanogenní glykosidy	23
3.2.1 Reakce a změny	25
3.2.2 Toxicita kyanogenních glykosidů	27
3.3 Amygdalin: vlastnosti a účinek na organismus teplokrevných živočichů, včetně lidí	28
3.3.1 Amygdalin a jeho možné protirakovinné vlastnosti	34
3.3.2 Složení jablečných semen.....	38
3.3.2.1 Amygdalin v jablkách	39
3.3.2.2 Obsah amygdalinu v rostlinách.....	40
3.4 Metody stanovení amygdalinu.....	41
3.4.1 Metody extrakce amygdalinu	41
3.4.2 Metody stanovení amygdalinu metodou HPLC.....	43
4 Metodika	44
4.1 Použité chemikálie.....	44
4.2 Pomůcky	44
4.3 Přístroje.....	44
4.4 Experimentální material	45
4.4.1 Příprava vzorku	45
4.4.2 HPLC stanovení	46
5 Výsledky	46

6	Diskuze	47
7	Závěr	49
8	Literatura	50
9	Seznam obrázků.....	56

1 Úvod

Použití biologicky aktivních látek ve formě přírodních rostlinných extraktů v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu je významné pro výzkum po celém světě. V tomto ohledu je třeba hledat nejvhodnější rostliny s vysokým potenciálem pro syntézu těchto látek. Přírodní rostlinné výtažky mají absolutní výhodu oproti produktům syntetického původu. Farmakologický účinek přírodních rostlinných extraktů na lidské tělo se liší od syntetických extraktů univerzálním účinkem, užším rozsahem vedlejších účinků a slabými alergickými vlastnostmi. Produkce přírodních rostlinných výtažků vyžaduje zapojení nových druhů surovin.

Je však nutné si uvědomit, že ne všechny látky, které jsou syntetizovány v těle rostlin, lze považovat za prospěšné pro lidské zdraví. Rostliny používají mnoho sekundárních metabolitů k ochraně a odpuzování škůdců a jsou jedovaté. V jistém smyslu jsou všechny léky jedy. Je důležité vědět, jak a za jakým účelem je použít.

Od pradávna se plody rostlin *Prunus* a *Maleae* používají pro potravinářské a léčebné účely. Charakteristickým rysem rostlin těchto rodů je přítomnost glykosidu amygdalinu a benzaldehydu. Benzaldehyd se v současnosti v potravinářském a kosmetickém průmyslu používá jako aroma. Zavádění benzaldehydu kosmetických přípravků a formulace potravinářských výrobků a nápojů se provádí jak ve formě čistého přípravku, tak ve formě hořkého mandlového oleje a dodává konečnému produktu bohatou mandlovou chuť a vůni (Fadeeva 2000).

Skutečnost, že látky získané ze semen některých rostlin rodu *Prunus* a *Maleae* jsou biologicky aktivní, je lidstvu již dlouho známa. Například ve starověkém Egyptě byla látka extrahovaná ze semen broskví použita jako jed. Dnes je známo, že to byl amygdalin, s něhož se uvolňuje kyselina kyanovodíková, která vstupuje do lidského těla.

Poprvé byl izolován čistý amygdalin v 19. století. Ve druhé polovině 20. století americký biochemik E. Krebs ve snaze syntetizovat amygdalin syntetizoval látku, kterou nazval Laetрил. Laetрил je velmi podobný amygdalinu. Krebs tvrdil, že tato látka je vitamínem B₁₇ a má protirakovinový účinek. Od té doby probíhá ve vědeckém světě diskuse o amygdalinu a jeho vlastnostech. Po více než půl století byly provedeny různé studie. Bylo zjištěno, že amygdalin se nachází v semenech více než 1000 rostlin, včetně semen jablek.

Jablka jsou jedním z nejpopulárnějších plodů v České republice. Plody jabloní mají dobrou chuť a dietické vlastnosti. Mají širokou škálu zrání a jsou vhodné pro čerstvou spotřebu a zpracování, jakož i pro krmení domácích zvířat jako doplněk.

Lze říci, že studium dostupných údajů o amygdalinu obsaženém v jablečných semenech je pro výzkum důležitým tématem. Díky rozvoji vědy a techniky se dnes člověk může lépe seznámit s tím, co může mít vliv na jeho zdraví a kvalitu života.

2 Cíl práce

Cílem bylo získat co nejvíce všeobecných informací o amygdalinu, jeho množství v krmivech a potravinách, biochemii jeho syntézy a jeho působení v organismu. Zjistit, zda je amygdalin, který je součástí některých rostlin, zejména semen jablek, které člověk konzumuje a používá jako krmivo pro hospodářská zvířata, ohrožením nebo potenciálním zdrojem zlepšení zdraví.

3 Literární rešerše

Vzhledem k tomu, že amygdalin byl poprvé získán v čisté formě v roce 1830, existuje hodně literárních pramen popisujících jeho vlastnosti. Přesnější metody studia chemických látek se však objevily ve 20. století a ve většině případů byly vyvinuty ve druhé polovině 20. století. K popisu obecných chemických vlastností glykosidů, ke kterým amygdalin patří, byly použity takové zdroje, jako je „Analýza organických sloučenin“ Bauera (1953), kde jsou brány v úvahu hlavní charakteristiky a reakce organických sloučenin. Takového staré zdroje však nestačí ke komplexní analýze vlastností glykosidů a amygdalinu.

Pro konkrétnější a podrobnější analýzu vlastností glykosidů použity a popsány práce Veliška (2009) a Kysilka (2001), ve kterých byly podrobněji zkoumány různé sloučeniny patřící mezi glykosidy. Amygdalin patří ke kyanogenním glykosidům, které mají své vlastní kvalitativní vlastnosti. Také pro studium vlastností amygdalinu byly použity různé cizí zdroje k vytvoření úplnějšího obrazu.

K dosažení cíle bakalařské práce, konkrétně k nalezení odpovědi na otázku, zda je amygdalin jed, vitamin nebo lék, byly analyzovány moderní vědecké publikace, a to od okamžiku, kdy byla oznámena syntéza Laetrilu. Práce Lehmana (1977), věnovaná studiu vlivu Laetrilu na zvířata a rakovinné buňky, poskytuje kvalitativní informace o studiích *in vivo* prováděných ve druhé polovině 20. století. V této práci jsou zkoumány taky právní a sociálně-ekonomické důsledky používání Laetrilu a je studována role výchovy ke zdraví v boji proti problému neefektivnosti Laetrilu. Moderní vědecké články věnované problému amygdalinu a rakovinných buněk, publikované v posledních 10 letech, jsou většinou založeny na studiích *in vitro*. Na základě provedené literární rešerše bylo zjištěno, že tomuto problému je věnováno mnoho prací čínských vědců a některé z nich mají velmi specifický a úzký charakter. Práce „Inhibition of cell growth and down-regulation of telomerase activity by amygdalin in human cancer cell lines“ (Moon et al. 2015) se věnuje studiu vlivu amygdalinu na růst buněk a aktivitu telomerázy při humánní rakovině a buněčných liniích fibroblastů MRC-5. V důsledku své práce autoři dospěli k závěru, že léčba amygdalinem nabízí cennou možnost léčby rakoviny, neboť způsobuje inhibici buněčného růstu a inhibici telomerasové aktivity v lidských rakovinových buněčných liniích zvyšováním aktivity β -glukosidázy. Tyto studie jsou zajímavé, vyžadují však testování *in vivo*.

Nejcennějšími pracemi však byly vědecké články o amygdalinu v jablečných semenech. Stojí za zmínku, že neexistují mnoho studií věnovaných jablečkům, protože tradičním rostlinným materiálem pro extrakci amygdalinu jsou hořké mandle a semena broskví a meruněk. Článek skupiny vědců Senica, Stampar, Veberic, Mikulic-Petkovsek (2019) je věnován jablečným semenům a jejich analýze. Autoři uvádějí, že i když jsou ovocná semena považována za odpad, mají v lidské stravě dobrý potenciál. V této studii byly studovány hladiny biologicky aktivních látek (fenolických a kyanogenních glykosidů) v semenech jablek odrůdy Golden Delicious pěstovaných ve čtyřech různých sadech světa a jejich změny během 8 měsíců skladování. Výzkumné metody a jejich výsledky jsou zajímavé a mohou sloužit jako dobrý základ pro další výzkum jablek jiných odrůd.

Analýza odborné literatury obecně ukázala, že otázkou studia vlivu amygdalinu na lidské zdraví se zabývá poměrně široká škála článků. Prací věnovaných konkrétním rostlinám

a obsahu amygdalinu v jejich semenech je méně. Zdá se, že toto je slibná oblast pro další výzkum.

3.1 Glykosidy jako sekundární metabolity rostlin

3.1.1 Sekundární metabolity, biologická aktivita a toxicita některých rostlinných látek.

Použití biologicky aktivních látek ve formě přírodních rostlinných extraktů v potravinářském, voňavkářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu je po celém světě velmi žádané. Z tohoto důvodu je třeba hledat nejvhodnější rostliny s vysokým potenciálem pro syntézu biologicky aktivních látek.

Přírodní rostlinné výtažky mají absolutní výhodu před produkty syntetického původu. Farmakologický účinek přírodních rostlinných extraktů na lidské tělo se liší od syntetických extraktů univerzálním účinkem, užším rozsahem vedlejších účinků a slabými alergieními vlastnostmi.

Moderní vědecký výzkum v oblasti chemie přírodních látek se stále více zaměřuje na jejich izolaci a následnou charakterizaci účinné látky v rostlinných extraktech. Biologicky aktivní sloučeniny v rostlinách mají zpravidla nízkou molekulovou hmotnost a patří k sekundárním metabolitům.

Termín „látky sekundárního původu“ má velké množství významů, jelikož se mnoho těchto látek považuje za nejdůležitější fyziologicky aktivní sloučeniny, které hrají primární roli v procesech dýchání a fotosyntézy. Lze však říci, že kromě primárních metabolitů – cukrů, aminokyselin, mastných kyselin, chlorofylů, cytochromů a nukleotidů existují sloučeniny, které jsou meziprodukty různých metabolických reakcí. Rostliny obsahují velké množství látek, které se nepodílejí na hlavním metabolismu. Nazývají se sekundární metabolity nebo látky sekundárního původu. Na rozdíl od primárních metabolitů přítomných ve všech rostlinných buňkách mohou být sekundární metabolity specifické pro jeden nebo více rostlinných druhů. Sekundární metabolity jsou organické molekuly, které se neúčastní růstu a vývoje organismu. Absence sekundárních metabolitů nevede k okamžité smrti, ale spíše k dlouhodobému zhoršení schopnosti organismu přežít. Sekundární metabolity často hrají důležitou roli v obraně rostlin. Tyto sloučeniny jsou velmi rozmanitou skupinou přírodních produktů syntetizovaných rostlinami, houbami, bakteriemi, řasami a živočichy. Většina sekundárních metabolitů, jako jsou terpeny, fenolové sloučeniny a alkaloidy, je klasifikována na základě jejich biosyntetického původu. Různé třídy těchto sloučenin jsou často spojovány s úzkým souborem druhů v rámci fylogenetické skupiny a tvoří bioaktivní sloučeniny v několika léčivých a aromatických látkách, dále v barvivu a koření a/nebo ve funkčních látkách.

Sekundární metabolity jsou často produkovány na nejvyšší úrovni během přechodu z aktivního růstu do stacionární fáze. Producentický organismus může růst bez jejich syntézy, což naznačuje, že sekundární metabolismus není nezbytný, alespoň pro krátkodobé přežití. Z jiného hlediska je však nutné, aby geny zapojené do sekundárního metabolismu poskytovaly „genetické podmínky“, které umožňují mutaci a nabídku nových prospěšných vlastností prostřednictvím evoluce. Třetí pohled charakterizuje sekundární metabolismus jako

nedílnou součástí buněčného metabolismu a biologie; spoléhá na primární metabolismus, který dodává potřebné enzymy, energii, substráty a buněčné materiály a přispívá k dlouhodobému přežití producenta (Linz et al. 2011).

Nejpočetnější skupiny sekundárních metabolitů jsou: isoprenoidy, fenolické sloučeniny a alkaloidy. Každá z těchto skupin je rozdělena do mnoha podskupin. Kromě těchto hlavních skupin se dále rozlišují menší třídy sekundárních sloučenin rostlinného původu: kyanogenní glykosidy, glykosidy obsahující síru (thioglykosidy), rostlinné aminy, neproteinové aminokyseliny, polyacetyleny, betalainy, thiofeny atd. Někteří autoři také řadí mezi látky sekundárního metabolismu alifatické organické kyseliny a fytohormony.

Z výše uvedeného vyplývá, že biologicky aktivní látky zahrnují velké množství různých sloučenin. Většina autorů považuje za nejdůležitější z nich alkaloidy, glykosidy, gumy a vitamíny (Vagazova 2010). Ne všechny biologicky aktivní látky obsažené v rostlinném materiálu jsou však stejně užitečné a bezpečné pro ostatní živé organismy.

Rostliny syntetizují velké množství látek toxických pro savce, lidi a další živé tvory. Nazývají se fytotoxiny. Fytotoxiny, které jsou produkty metabolismu rostlin, vykonávají například ochranné funkce. Z velké části však zůstává jejich význam pro život rostlin neznámý. Fytotoxiny jsou látky s různými strukturami a nerovnoměrnou biologickou aktivitou. Mezi nimi jsou alkaloidy, organické kyseliny, terpenoidy, lipidy, glykosidy, flavonoidy, kumariny atd.

Existují různé klasifikace jedovatých rostlin, založené zejména na specifickém složení nebo toxických účincích biologicky aktivních látek. Mezi celou řadu jedovatých rostlin patří:

- bezpodmínečně jedovaté rostliny (s podskupinou vysoce jedovatých),
- podmíněně jedovaté – toxické pouze na určitých místech růstu nebo při nesprávném skladování surovin, při enzymatickém účinku hub a jiných mikroorganismů (Neznamova 2007).

Jedovaté rostliny jsou považovány za rostliny produkující toxické látky – fytotoxiny, a to i v malém množství, které způsobuje poškození těla a smrt lidí a zvířat.

Toxicita různých rostlin se může lišit v závislosti na poloze druhu v zeměpisné oblasti, povaze půdy a stanoviště, klimatických podmínkách v průběhu roku nebo stádiu vývoje.

Toxické vlastnosti stejných rostlin nemají stejný účinek na jednotlivé skupiny zvířat. Například *Atropa Belladonna* a *Datura*, které jsou pro člověka vysoce toxické, jsou naprosto neškodné pro hlodavce a psy, ale způsobují otravu kachen a kuřat.

Jedovaté rostliny jsou příčinou většiny otrav lidí a zvířat. V tomto případě stojí za zmínku zejména otrava dětí, které jsou přitahovány výraznými plody, šťavnatými kořeny, cibulemi a stonky.

Otrava rostlinnými produkty je někdy také spojena s konzumací medu kontaminovaného jedovatým pylem z rostlin, nebo rovněž mléka a masa poté, co zvířata pozřou toxické rostliny (Neznamova 2007).

Biologicky aktivní látkou, na kterou je tato práce zaměřena je amygdalin. Amygdalin patří mezi organické sloučeniny, mandelický nitrilový gencybiosid, kyanogenní glykosid, který se nachází v jádrech semen mnoha rostlin čeledi růžovitých (*Rosaceae*) a dodává jim hořkou chuť. Poprvé byl izolován z hořké mandle *Prunus amygdalus var. Amara*. Nachází se také v jádrech broskve a meruňky. Jeho strukturu tvoří kosočtverečné krystaly s teplotou tání 215 ° C (Raquel et al. 2008).

3.1.2 Charakteristika glykosidů.

Amygdalin patří do skupiny glykosidů. Glykosidy jsou organické sloučeniny, zpravidla rostlinného původu, které se při hydrolýze štěpí na cukr a složku necukernou, zvanou aglykon. Aglykon a cukr jsou propojeny vazbou podobnou esterické vazbě, proto je glykosidová molekula snadno rozrušena v přítomnosti vody za účasti enzymů obsažených v těchto rostlinách. Glykosidy jsou deriváty monosacharidů, jejichž glykosidická (poloacetalová) hydroxyskupina je substituována, jsou to tedy úplné acetaly. Rozlišují se dvě skupiny – holosidy a heterosidy. Lze je dělit na oligosacharidy a polysacharidy (tzv. holosidy), protože je v nich glykosidická skupina substituována hydroxylovou skupinou dalšího monosacharidu. Jestliže se mluví o glykosidech, myslí je tím heterosidy, ve kterých je substituentem nukleofilní seskupení nesacharidického charakteru. Glykosidy v pravém slova smyslu jsou tedy sloučeniny, které obsahují jednu nebo více monosacharidových jednotek a alespoň jednu nesacharidovou součást, tzv. aglykon nebo také genin. Při biosyntéze glykosidů je důležitý aldosa-1-fosfát jako dárce glykosylových jednotek (Kysilka 2001).

V glykosidech bývá sacharidový řetězec často krátký a jen v několika málo sloučeninách, jako jsou steroidní alkaloidy a saponiny, je tento řetězec větvený. Cukernou složku tvoří nejčastěji glukóza, rhamnóza, arabinóza, xylóza, řidčeji pak deoxycukry jako digitoxóza a cymaróza. Žádné absolutní omezení však v této oblasti neexistuje. Podle počtu monosacharidů, které jsou v řetězci navázány na aglykon, se rozlišují monoglykosidy, diglykosidy a triglykosidy. Jsou-li tyto sacharidy navázány pouze v jedné poloze na aglykonu, hovoří se o tzv. monodesmosidech, jsou-li navázány na dvou místech, jedná se o bidesmosidy (například některé saponiny). Prakticky všechny přírodní glykosidy patří mezi β -glykosidy, pouze některé glykosidy L-cukrů (například L-rhamnózy) jsou vázány α -glykosidickou vazbou. Aglykony mohou být nejrozličnější látky. Musí však obsahovat skupinu schopnou glykosidové vazby. Tuto podmínku splňují alkoholy, fenoly, thioalkoholy, aminy a podobné látky (Kysilka 2001).

Všechny glykosidy se vyznačují nepřítomností tautomerních transformací v roztoku, tj. jejich přechod na acyklickou formu je nemožný, jelikož tento proces vyžaduje mobilní atom vodíku v poloacetalovém hydroxyly. Takováto forma hydroxyly se poté musí přeměnit na karbonylovou skupinu. Druhou společnou vlastností glykosidů je jejich poměrně snadná schopnost hydrolyzovat v kyselém prostředí, což je vlastně proces opačný k reakci jejich tvorby (Plemenkov 2001).

Glykosidy jsou jednou z nejčastěji se vyskytujících skupin přírodních sloučenin. Jedna rostlina obvykle obsahuje několik typů glykosidů. Například v listech náprstníku červeného (*Digitalis purpurea*) se nachází až 70 různých glykosidů. V rostlinách jsou glykosidy obsaženy v různých rostlinných orgánech, a to v rozpuštěné formě v buněčné míze. Rostliny obsahující glykosidy přitahovaly pozornost od starověku. Už Egypťané a Římané používali *Drimia maritima* ke stimulaci srdeční činnosti. Přípravky ze semen a kůry krutíkvětu (*Strophantus hispidus*) byly použity nejen ke stimulaci srdeční aktivity, ale také k otravě šípů. Historie objevu glykosidů je spojena s náprstníkem červeným, který přešel od původní bylinné léčby (v té době jediný způsob léčby) k modernímu, nepostradatelnému léčivu. Poprvé jej začali používat léčitelé z Irsku a Anglie. Používal se jako projímadlo, prostředek pro vyvolání zvracení a vykašlávání hlenů (Karpuk 2011).

3.1.3 Reakce a změny glykosidů.

Podle atomu, kterým je navázána nesacharidová část glykosidu, se rozlišují O-, N-, S- a C- glykosidy. Chemické vlastnosti glykosidů jsou rozmanité a jsou způsobeny přítomností glykosidické vazby, jakož i strukturními rysy aglykonů tj. cukrů. Většina glykosidů jsou nestabilní sloučeniny, protože díky glykosidické vazbě jsou hydrolyzovány v přítomnosti vody enzymy, tzv. glykosidázami, jakož i kyselinami různých koncentrací, méně často těž alkaliemi (S-glykosidy). Podle typu štěpené glykosidické vazby se rozlišují α -glykosidázy a β -glykosidázy. Thioglykosidy se štěpí enzymem myrosináza (thioglykosidáza). Enzymy a glykosidy bývají v rostlině uloženy odděleně a přijdou do kontaktu až v případě porušení pletiva nebo následkem odumírání pletiva (Kysilka 2001).

S-glykosidy, které jsou hydrolyzovány pouze koncentrovanými kyselinami nebo jejich směsí, jsou nejodolnější vůči kyselé hydrolyze. Pokud jsou v glykosidové molekule dva a více monosacharidů nebo jejich deriváty (uronové kyseliny, alkoholy), dochází často k tzv. postupné hydrolyze, při které se cukry postupně odštěpují. Produkty postupné hydrolyzy glykosidů se nazývají sekundární glykosidy, na rozdíl od nativních (primárních) glykosidů obsažených v živé rostlině (Karpuk 2011).

Syntéza glykosidů zahrnuje jednak syntézu aglykonu, která je pro velkou rozmanitost aglykonů též dosti různorodá, a glykosylaci aglykonu. Při ní hrají důležitou roli enzymy glykosyltransferázy, které umožňují přenos glykosylových zbytků. Tvorba glykosidů má pro rostlinu zejména význam detoxikační, přičemž lipofilní toxické látky se po navázání cukru stávají rozpustnými ve vodě a mohou být snadno vyloučeny, obvykle do buněčné šťávy vakuol, ale i do jiných částí rostlinné buňky (Kysilka 2001).

Jak uvádí jeden z prvních zdrojů zabývajících touto problematikou (Fenolické sloučeniny a jejich biologické funkce. Moskva, 1968), charakteristickou reakcí glykosidů je enzymatické štěpení, které umožňuje nejen stanovit přítomnost glykosidů, ale také stanovit konfiguraci glykosidických vazeb a někdy i pořadí vazeb mezi sacharidy. Nejčastěji k tomu dochází pomocí enzymu emulsin. Každý glykosid je charakterizován vlastním indexem regenerace enzymu. Tímto indexem se rozumí obsah glukózy vyjádřený v miligramech na 100 ml zkoušeného roztoku. Ten se vytvoří hydrolyzou v množství potřebném ke změně rotace o 1° doprava v zkumavce dlouhé 20 cm.

Pro charakteristiku obecných věcí uvádí Bauer (1953), že barevné glykosidové reakce jsou obvykle vhodné pouze v nepřítomnosti volných cukrů. Mnoho glykosidů s vyčištěnou žlučovou žlučí a kyselinou sírovou dává červenou barvu. Alkoholický 20% roztok α -naftolu s koncentrovanou kyselinou sírovou tvoří modrou a fialovou barvu. Podobné zbarvení nastává v případě použití p -naftolu nebo resorcinolu. Glykosidy obsahují fenol nebo fenolové hydroxylové sloučeniny jako aglykon poskytující žlutou barvu po reakci s chloridem železitým. U některých glykosidů reakce probíhá intenzivněji s použitím roztoků alkoholických činidel.

Glykosidy, jejichž aglykony obsahují karbonylovou skupinu, jsou identifikovány jako hydrazony, semikarbazony nebo oximy. Při pečlivé acetylaci anhydridem octové kyseliny poskytuje mnoho glykosidů charakteristické acetylderiváty. Působení acetylační směsi se někdy používá k důkazu glukózy jako cukerné složky glykosidu. Jeho objev je založen na přeměně pentaacetylglukózy získané acetylací na pentaacetylglukosyl- p -toluidid působením

p-toluidinu. Tato sloučenina je nerozpustná v alkoholu, je levotočivá a má vysokou teplotu tání (Khaletsky 1966).

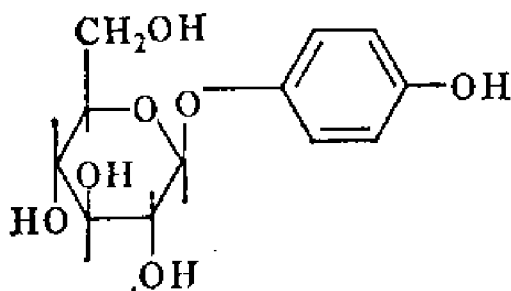
Glykosidy hrají důležitou roli v životě rostlinného organismu:

- 1) účastní se redoxních reakcí v rostlinné buňce,
- 2) jsou nosiči cukru,
- 3) jsou nezbytnou součástí v období intenzivního růstu a vývoje rostliny.

Ve většině případů je biologický význam glykosidů zajištěn strukturou aglykonu (Karpuk 2011).

Dále mohou sloužit jako toxiny, odpuzující případné predátory. Glykosidy tvoří pestrou skupinu látek. Podle struktury aglykonu se glykosidy dělí do několika skupin na fenolové glykosidy, kumariny a jejich deriváty, flavonoidové glykosidy, antokyanidinové glykosidy, antrachinonové glykosidy, kardioaktivní glykosidy, saponiny, kyanogenní glykosidy, glukosinoláty (thioglykosidy) a glykosidy s iridoidovým aglykonem.

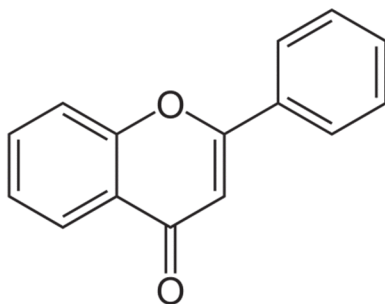
3.1.4 Fenolové glykosidy.



Obrázek 1. Fenolové glykosidy

Fenolické glykosidy obsahují sacharid navázaný na fenolickou skupinu. Aglykon fenolových glykosidů je tvořen aromatickým jádrem s rozdílným biogenetickým původem (Pavlíková 2009). Část aglykonů je odvozená od šikimové kyseliny, jiná od octové kyseliny. Hodně fenolických látek v rostlině existuje v glykosidické formě, která se po sběru odštěpuje a uvolňuje se tak sama aktivní sloučenina. To je například případ vanilinu nebo salicinu. Floridzin se vyskytuje v některých druzích čeledi vřesovcovitých (*Ericaceae*) a také v kůře kořenů stromů čeledi růžovitých (*Rosaceae*), jako jsou jabloně, hrušně či třešně. Zvyšuje vylučování cukru močí, blokuje zpětnou resorpci glukózy a snižuje koncentraci glukózy v krvi (způsobuje hypoglykémii) (Pavlíková 2009).

3.1.5 Flavonoidy.



Obrázek 2. Flavony

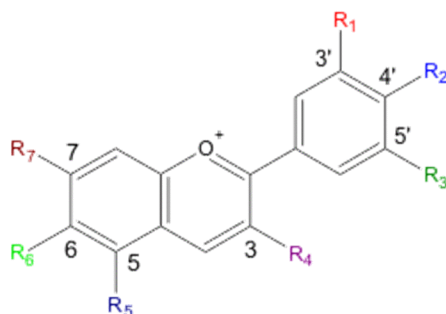
Flavonoidy jsou deriváty fenylchromanu. Podle místa, kde je fenyllová skupina navázána, se rozlišují flavany, isoflavany a neoflavany. Nejčastěji se vyskytují deriváty flavanu. Isoflavany jsou méně časté a neoflavany jsou celkem vzácné. Deriváty flavanu se dělí do několika skupin podle oxidace pyranového kruhu. Flavony obsahují jen ketoskupinu, flavanoly obsahují kromě ketoskupiny ještě tři hydroxyskupiny a flavanony obsahují dvě hydroxyskupiny.

Flavonoidy jsou obvykle rozpuštěny v buněčné šťávě vakuol a vyskytují se většinou glykosidicky vázané. Metoxyderiváty flavonoidů jsou lipofilní a jsou obsaženy též v silicích. V živém organismu jsou flavonoidy pravděpodobně zapojeny do oxidačně-redukčních procesů.

Flavonoidy způsobují obnovu propustnosti kapilár, odstraňují jejich lámavost, působí protikrvácivě. Brání šíření mikrobiálních toxinů, a proto podporují léčbu infekčních onemocnění. Některé flavonoidy působí močopudně, rozšiřují cévy a snižují krevní tlak. S vápenatými ionty vytvářejí flavonoidy komplexní soli, čímž brání srážení krve a zadržují v organismu vápník. Podporují tvorbu žluči a působí též protikřečově. Posilují účinek vitamínu C v organismu. Účinné jsou jak glykosidy, tak jejich aglykony.

Mezi nejvýznamnější flavonoidy patří rutin, hesperidin a kvercetinové glykosidy, jako je kvercetin, hyperosid nebo kvercitrin (Kysilka 2001).

3.1.6 Antokyany.



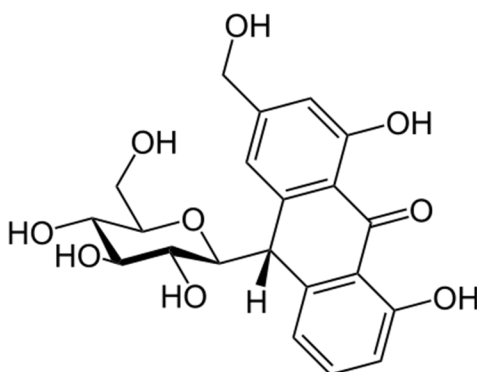
Obrázek 3. Antokyany

Antokyany podmiňují červené, fialové, případně modré zbarvení zejména květů, ale též jiných rostlinných částí, jako jsou plody, listy či natě, řidčeji kořenů nebo dřeva. Jsou

uloženy v buněčných šťávách jako glykosidy. Dnes je známo asi 25 aglykonů a 300 různých antokyanů. Biochemicky jsou úzce spjaty s flavonoidy, neboť jde o deriváty flavanu. Aglykonová část se označuje jako antokyanidin. Antokyanidiny jsou slabé zásady a tvoří krystalické oxoniové soli, obsahující benzopyrilium. Cukry, nejčastěji glukóza, řidčeji galaktóza a velmi vzácně rhamnóza, xylóza či arabinóza, se vážou obvykle na třetí uhlík, někdy také na uhlík pátý nebo sedmý.

Zbarvení antokyaninů závisí na pH buněčné šťávy. V kyselém prostředí jsou zbarveny červeně. Alkalizací přecházejí do modré barvy. Ve velmi zásaditém prostředí dosahují v umělých podmínkách až žlutavě zeleného zbarvení. Zbarvení antokyanů závisí též na vzniku jejich komplexu s iontem kovu, například železitým nebo hliníovým. Antokyaniny mají vliv na propustnost buněčných blán vlásečnic a mají protizánětlivé účinky. Používají se při očních zánětech či při mikrokrváceních. K významným antokyaninům patří pelargonidin, kyanidin, malvidin, peonidin a petunidin (Kysilka 2001).

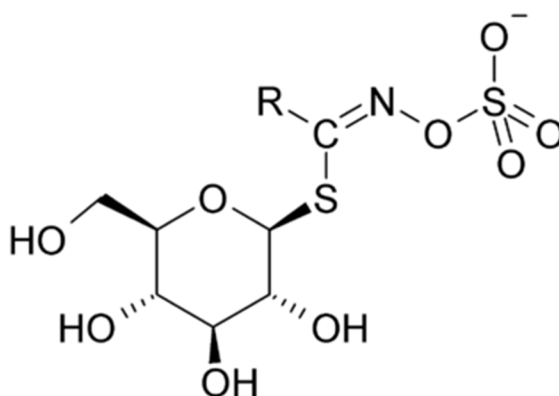
3.1.7 Antrachinonové glykosidy.



Obrázek 4. Antrachinonový glykosid

Struktura těchto glykosidů se odvozuje od aromatického uhlovodíku antracenu. Drogy obsahují antrachinon, ale též jeho redukované deriváty – antrahydrochinon, oxantron, antron a antranol. Cukernou složkou těchto látek je nejčastěji glukóza a rhamnóza, vázané obvykle na prvním, šestém či osmém uhlíku. Další substituent je obvykle v poloze 3. Kromě monomerních antrachinonů se vyskytují též dimerní sloučeniny – diantrony. Obsah antrachinonových látek se mění v průběhu života rostliny i během skladování. Mění se zejména poměr oxidovaných a redukovaných forem, mění se též poměr volných a glykosidicky vázaných sloučenin. Antrachinonové deriváty působí v tlustém střevě jako projímadla. Glykosidické formy jsou méně rozpustné v tucích, a proto se méně vstřebávají v žaludku a tenkém střevě. V tlustém střevě se poté z glykosidu působením střevních bakterií uvolňuje účinný aglykon. Nejúčinnější jsou antrony a diantrony (Kysilka 2001).

3.1.8 Glukosinoláty.



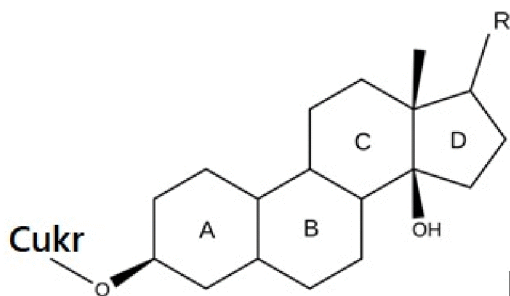
Obrázek 5. Glukosinoláty

Hořčičné glykosidy neboli glukosinoláty jsou sirné glukosidy. Aglykon je tvořen C=N skupinou substituovanou sulfátem na dusíku, na které je navázána jednak S-glykosidickou vazbu β -D-glukopyranóza, jednak ještě další zbytek, který je charakteristický pro ten či onen glukosinolát.

Glukosinoláty jsou hydrolyzovány pomocí enzymů thioglukosidických glukohydroláz, tzv. myrosináz. Hydrolýzou těchto sloučenin se získá glukóza, síran a nestabilní aglykon. Tento aglykon se dále přeměňuje za vzniku isothiokyanátů, tzv. hořčičných olejů. Glukosinoláty jsou vytvářeny z aminokyselin, a to jak proteinogenních, tak neproteinogenních. Mechanismus jejich vzniku je podobný jako u kyanogenních glykosidů. Zdrojem síry bývá nejčastěji aminokyselina L-cystein. Hořčičné oleje, které vznikají při rozkladu glukosinolátů, jsou odpovědné za typický dráždivý zápach čeledi brukvovitých. Tento zápach může chránit rostlinu před škůdci a predátory. Byla také prokázána hormonální funkce některých sloučenin odvozených od glukosinolátů. Například indolacetonitril, odvozený od glukobrassicinu, vykazuje aktivitu auxinu v rostlinách (Kysilka 2001).

Glukosinoláty, dříve nazývané thioglukosidy, tvoří významnou skupinu více než 150 sekundárních metabolitů výlučně dvouděložných rostlin čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Glukosinoláty jsou například zodpovědné za typické štiplavou chuť semen řepky, aromatu hořčice, křenu, ředkve a jiných druhů zelenin a některého koření. Proto se dříve také nazývaly glykosidy hořčičných olejů (Velíšek 2009). Glukosinoláty jsou řazeny mezi antinutriční faktory interferující s metabolismem jodu, protože řepkový šrot používaný jako krmivo pro hospodářská zvířata má strumigenní (goitrogenní) účinky. Současný výzkum je zaměřen především na biologické vlastnosti degradačních produktů glukosinolátů a hodnocení jejich pozitivního, ale i negativního působení na zdraví člověka (Velíšek 2009).

3.1.9 Kardioglykosidy.

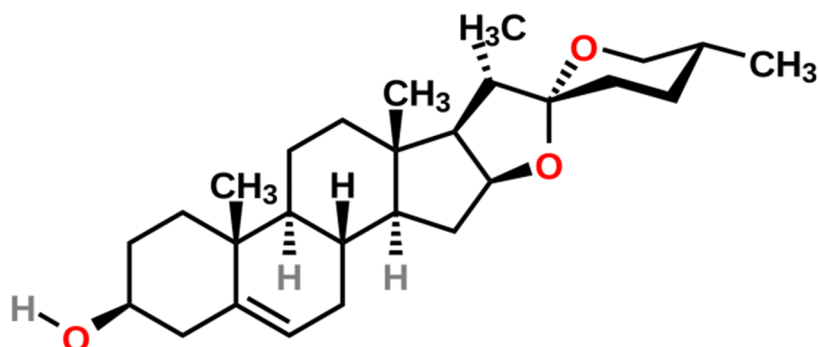


Obrázek 6. Kardioglykosidy

Kardioaktivní glykosidy, kardioglykosidy jsou glykosidy, jejichž aglykon je steroidního charakteru. Mají specifický účinek na srdeční sval. Nositelem tohoto účinku je steroidní aglykon, účinek je však mnohonásobně zesílen přítomností až pěti molekul sacharidů, které se svou strukturou často liší od běžných, primárních sacharidů. Aglykon ani monosacharidy jako takové však kardiotonický účinek nemají, účinný je až vlastní glykosid. Glykosidy působí na srdeční sval silněji než samotné aglykony, protože jsou hydrofilnější a mohou se tak silněji vázat. Dělí se na kardenolidy (kardioglykosidy typu *digitalis*) a bufadienolidy (kardioglykosidy typu *scilla-bufo*). Základním strukturním prvkem kardenolidů je kardenolid, což je substituovaný derivát steranu, obsahující navíc pětičlenný γ -laktonový nenasycený kruh. Základ bufadienolidů tvoří bufadienolid – taktéž substituovaný derivát steranu, navázaný je však šestičlenný δ -laktonový nenasycený kruh. Jednotlivé kardioglykosidy se dále liší polohou, počtem a druhem substituentů, v počtu dvojných vazeb a v počtu a druhu cukrů. Jejich účinnost je výrazně ovlivněna stereochemií. Mnohdy jen malá změna ve stereochemii má rapidní vliv na účinnost glykosidu. Kardenolidy mají 2 až 7krát vyšší účinek než bufadienolidy. Cukernou složku mohou tvořit běžné cukry (např. D-glukóza, L-rhamnóza), ale také cukry, které dosud nebyly nalezeny v jiných glykosidech (zejména 6-deoxycukry, methylpentosy, 2,6-deoxycukry a jejich 3-methylethery) (Kysilka 2001).

Kardioglykosidy zvyšují napětí a sílu stahu srdeční svaloviny, podporují tedy srdeční činnost. Mechanismus tohoto působení není ještě zcela objasněn. Zřejmě ovlivňují iontový metabolismus tak, že inhibují některé v tomto metabolismu významné enzymy. Jde zejména o vztah sodíku a draslíku, kdy kardioglykosidy soutěží s draslíkem o obsazení membránového enzymu $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-ázy}$, kterou tak inhibují. Útlum tohoto enzymu se nejspíše kompenzuje zvýšením účinnosti výměnného systému $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$, čímž se zvýší množství snadno přenosného vápníku v membránových strukturách buněk srdeční svaloviny. Kardioglykosidy tedy zvyšují přívod vápenatých iontů, které se poté uvolňují z membránových struktur do cytoplasmy buněk srdeční svaloviny a zvyšují sílu stahu. Zvýšený přívod vápenatých iontů usnadňuje tvorbu aktinomyosinu. Nedostatek vápenatých iontů vede k zesílení účinku i toxicity kardioglykosidů, nedostatek draslíku působí opačně. Kardioglykosidy také nepřímo působí močopudně a dráždí též zóny pro zvracení v prodloužené míše, čímž mohou vyvolat zvracivost až anorexii. Všechny kardioglykosidy jsou toxické (Oweis et al. 2006).

3.1.10 Saponiny.



Obrázek 7. Saponiny

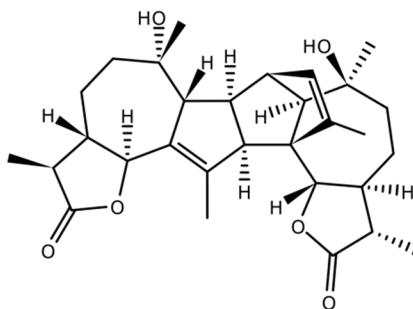
Saponiny jsou skupinou přírodních směsí obsahujících triterpenoidální nebo steroidní aglykon, nazývaný genin nebo sapogenin, kovalentně vázaný na jednu nebo více cukerných skupin (Augustin et al. 2011). Triterpeny patří do velké skupiny sloučenin, které mají řadu důležitých biologických aktivit. Vznikají ze skvalenu sprážením dvou farnesil-difosfátových jednotek (Abe 2007).

Saponiny jsou glykosidy isoprenoidového původu, jejichž vodné roztoky silně pěni. Pro tuto podobnost s mýdlem získaly svůj název (latinsky *sapo* = mýdlo). Pěnivost je podmíněna schopností snižovat povrchové napětí v heterogenních systémech. Mezi plynnou a tekutou fází vytvářejí pěnu, mezi dvěma kapalnými fázemi působí jako emulgátory, mezi tekutou a tuhou fází působí jako dispergující činidla. Kromě toho mají hemolyzující účinky. Používají se ve farmacii, v potravinářství a kosmetice. Pro své emulgační schopnosti se používaly jako prací prostředky. Hemolytické účinky saponinů znemožňují jejich injekční podávání. Saponiny působí většinou lokálně dráždivě, vyvolávají slzení, kýchaní a oční záněty. Ústně podávané saponiny se většinou nevstřebávají, a proto nepůsobí toxicky. Jsou však známy i výjimky. Saponiny jsou i ve vysokých zředěních jedovaté pro ryby a jiné vodní živočichy, protože patologicky zvyšují propustnost žaber a pokožky, čímž tyto živočichové ztrácejí důležité elektrolyty (Kysilka 2001).

Saponiny se využívají jako expektorancia, což znamená, že podporují odkašlávání. Povrchová aktivita saponinů podporuje zkapalnění hlenů a jiných sekretů. U látek nerozpustných nebo špatně rozpustných podporují saponiny vznik emulze či disperze. Lze využít též jejich schopnosti vázat se na cholesterol.

Saponiny se skládají z lipofilního aglykonu sapogeninu a z hydrofilní sacharidové složky. Podle struktury aglykonu se dělí na saponiny steroidní a triterpenické. Podle funkčních skupin a acidobazické reakce se rozlišují saponiny neutrální, kyselé a bazické. Kyselý charakter podmiňuje karboxylová skupina aglykonu nebo sacharidové složky, mezi kyselé saponiny patří většinou saponiny triterpenoidní. Bazické saponiny jsou některé steroidní saponiny, které obsahují v molekule dusík, a proto se řadí k steroidním alkaloidům.

3.1.11 Glykosidy s iridoidovým aglykonem (Hořčiny).



Obrázek 8. Hořčiny

Iridoidy jsou nejvýznamnější skupinou hořčin, jejichž aglykon je monoterpenický, nejčastěji odvozený od iridodialu. Jejich název je odvozen od mravenců rodu *Iridomyrmex*, kteří v případě ohrožení vylučují iridoidní látky. Iridoidy mohou být jak tuhé tak kapalné látky a jejich rozkladné produkty se barví tmavě, což způsobuje černání rostlin při neopatrném sušení. Mezi nejznámější iridoidy patří především loganin, swerciamarin, genciopikrosid, amarogentin, harpagosid, foliamentin, oleuropein a aukubin. Hořčiny díky své hořké chuti podporují tvorbu a vylučování žaludečních šťáv, jiný výrazný terapeutický účinek však nemají. Hořčiny s iridoidovým aglykonem jsou biogeneticky odvozeny od mevalonové kyseliny, přičemž aglykon může být monoterpenický, seskviterpenický, triterpenický i steroidní (Kysilka 2001).

3.2 Kyanogenní glykosidy.

Kyanogeneze je schopnost rostlin a také některých jiných organismů produkovat rozkladem kyanogenních sloučenin kyanovodík. Kyanogenní sloučeniny neboli kyanogeny byly prokázány v různých částech zhruba 3000 druhů rostlin řazených do 110 čeledí. Předpokládá se, že v rostlinách svou hořkou chutí, pachem a toxicitou vzniklých rozkladných produktů odpuzují predátory a účastní se metabolismu dusíku, neboť jsou jeho zásobní formou při klíčení semen a v počátečních fázích vývoje rostlin. Kyanogeny se dělí na tři základní skupiny:

- kyanogenní glykosidy (β -glykosidy 2-hydroxynitrilů, β -glykosidy kyanhydrinů)
- pseudokyanogenní glykosidy (glykosidy methylazoxymethanolu neboli azoxyglykosidy)
- kyanogenní lipidy (kyanolipidy, estery kyanhydrinů s mastnými kyselinami).

Kromě těchto kyanogenů akumulují některé vyšší rostliny při asimilaci kyanovodíku, také různé nitrily. Mnoho rostlin dále produkuje kyanidy jako vedlejší produkty biosyntézy rostlinného hormonu ethenu (Velíšek 2009).

Kyanogenní glykosidy, kterých je známo asi 75, jsou nejdůležitějšími a nejrozšířenějšími kyanogeny mnoha rostlin konzumovaných jako složky lidské potravy nebo používaných jako krmiva hospodářských zvířat. Nacházejí se hlavně v dvouděložných rostlinách čeledi bobovitých (*Fabaceae*), prýšcovitých (*Euphorbiaceae*) a mučenkovitých (*Passifloraceae*) a v jednoděložných rostlinách čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) a áronovitých

(*Araceae*). Obecně se určitý kyanogenní glykosid vyskytuje jen v jedné či dvou čeledích rostlin a jeden či dva kyanogenní glykosidy se nacházejí v jedné rostlině (Velíšek 2009).

Až na některé výjimky je cukrem vázaným v kyanogenních glykosidech monosacharid β -D-glukóza. Kyanogenní glykosidy se člení podle aminokyselin, ze kterých vznikají biosyntézou. Nejčastěji jsou odvozeny od pěti hydrofobních AMK: valinu (linamarin), isoleucinu (lotaustralin), leucinu (heterodendrin a epiheterodendrin), phenylalaninu (amygdalin a prunasin) a tyrosinu (dhurrin, taxifyllin a triglochinin). Kyanogenní glykosidy se odvozují od L-aminokyselin. V rostlinných buňkách, které jsou schopné syntetizovat tyto glykosidy, existuje komplex obsahující enzymy, které přemění L-aminokyselinu v několika krocích na kyanhydrin, který je vzápětí glykosylován. Kyanovodík, který se uvolňuje při rozkladu kyanogenních glykosidů, je v rostlinách detoxikován reakcí s aminokyselinou L-cysteinem, přičemž vzniká sulfan a L-asparagin. Rostliny tedy mohou kyanovodík využít k syntetickým účelům (Kysilka 2001).

Řada kyanogenních glykosidů je odvozena od aromatických AMK fenylalaninu (epimerní pár β -glukosid (R)-prunasin a (S)-sambunigrin) a tyrosinu (β -glukosid (R)-taxifyllin a epimerní (S)-dhurrin). Prunasin je kyanogenním β -glukosidem semen mnoha rostlin čeledi růžovitých (*Rosaceae*), slivoní (*Prunus spp.*), meruněk (*Armeniaca spp.*), broskvoní (*Persica spp.*), jabloní (*Malus spp.*), hrušní (*Pirus spp.*), kdouloní (*Cydonia spp.*), jeřábu (*Sorbus spp.*), skalníků (*Cotonoaster spp.*) a také mnoha akácií (*Acacia spp.*, bobovité, *Fabaceae*), přítomen je také v plodech mučenky (*Passiflora spp.*) (Velíšek 2009).

Stejný aglykon jako prunasin (nitril D-mandlové kyseliny) obsahuje amygdalin. V podmínkách ČR je amygdalin nejvýznamnějším kyanogenním glykosidem. Amygdalin je přítomný v rostlinách čeledi růžovitých (*Rosaceae*). Významnými zdroji jsou hořké mandle a pecky meruněk, broskví, švestek a třešní. V malém množství je také obsažen v jádrech jablek, hrušek a kdoulí. Množství amygdalinu není velké a není ani životu nebezpečné. K otravám dochází většinou jen náhodně, například při konzumaci většího množství pecek hořkých mandlí dětmi (Velíšek 2009).

Pseudokyanogenní glykosidy (azoxyglykosidy) se vyskytují v rostlinách čeledi cykasovitých (*Cycadaceae*). Pseudokyanogenní glykosid cikasin se vyskytuje v semenech cykasů. Tento druh sago se využívá jako zdroj škrobu. Cikasin má karcinogenní a mutagenní vlastnosti. Karcinogenní vlastnosti cikasinu se projevují při jeho rozkladu v těle působením beta-glukosidázy střevní flóry za vzniku aglykonu methylazoxymetanolu. Příjem cikasinu s pitnou vodou v dávce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ po dobu 10 dnů vedlo k vývoji nádorů jater potkanů ve více než 80 % případů. Nádory ledvin, střev, jater, plic a mozku mohou být vyvolány jedinou subkutánní injekcí cikasinu u novorozeneckých potkanů. U myši způsobuje cikasin hematomy, nádory ledvin, leukémii, plicní adenomy a u syrských křečků, morčat a akvarijních ryb nádory jater. Cikazin má také teratogenní vlastnosti (Petrovsky 1988). Výskyt neurologické poruchy připomínající Parkinsonovu chorobu byl zaznamenán v různých oblastech Pacifiku. Neurologicky poruchy mohou být také způsobeny přítomností lathyrogeneru 2,4-diaminomáslé kyseliny (Velíšek 2009).

Kyanogenní lipidy byly prokázány v semenech některých rostlin čeledi mýdelníkovitých (*Sapindaceae*), které se však pro lidskou výživu nepoužívají. Všechny kyanolipidy mají pětiuhlíkatý skelet odvozený od leucinu a kyanoskupinu s jednou nebo

dvěma hydroxyskupinami esterifikovanými mastnými kyselinami. Během hydrolyzy tvoří kyanolipidy volnou kyselinu kyanovodíkovou.

3.2.1 Reakce a změny.

Glukosinoláty jsou v rostlinném pletivu doprovázeny enzymem myrosinázou (thioglukosidglukohydrolázou), která katalyzuje jejich rozklad. Myrosináza je globulární glykoprotein skládající se z několika isoenzymů. Zvláštností je výskyt myrosinázy v některých mikroorganismech, v houbách a dokonce i v tkáních některých živočichů. V neporušeném pletivu je myrosináza umístěna od glukosinolitů odděleně, ovšem při mechanickém porušení buněk rostlinného pletiva (například krájení, kousání, pomrznutí či napadení škůdci) dochází k poměrně rychlé enzymové hydrolyze. Například v neporušených buňkách jetele plazivého je linamarin obsažen ve vakuolách, zatímco enzymy v buněčné stěně. Ke kontaktu substrátu s enzymy dochází po posečení rostlin, při drcení semen, žvýkání, působením ledových krystalků při pomrznutí, ale také při mimořádném suchu či napadení škůdci (Velíšek 2009). Rychlost hydrolyzy je dána aktivitou enzymu, kterou ovlivňuje řada faktorů (teplota a hodnota pH prostředí, druh a část rostliny či přítomnost látek působících jako aktivátory či inhibitory).

Samotná enzymová hydrolyza je zahájena myrosinázou katalyzovaným štěpením thioglukosidové vazby glukosinolátu. Hydrolyzou vzniká kromě D-glukózy nestabilní meziprodukt (aglykon, resp. sulfonát thiohydroximátu), který podléhá spontánní degradaci zahrnující odštěpení hydrogensíranu a stabilizaci zbylé části molekuly na některý ze stálejších produktů. Nejčastějšími rozkladnými produkty jsou isothiokyanáty a nitrily, nicméně v závislosti na vnějších podmínkách a struktuře glukosinolátu může vznikat řada dalších produktů. Isothiokyanaty a částečně i nitrily vznikající hydrolyzou alifatických glukosinolátů se značnou měrou podílejí na typické pálivé chuti některých brukvovitých zelenin (Velíšek 2009).

Průběh reakce je ovlivňován také teplem. Během tepelného zpracování zelenin dojde k inaktivaci enzymových systémů, včetně myrosinázy a epithiospecifického proteinu. V závislosti na teplotě a délce trvání tepelné úpravy jsou částečně rozkládány jak glukosinoláty (ke ztrátám dochází z velké části i výluhem), tak některé vznikající termolabilní produkty (například askorbigen). Kromě toho dochází k těkání řady látek, především nízkomolekulárních isothiokyanátů, čímž se výrazně změní aroma takto zpracované zeleniny. Porušení rostlinného pletiva, jemuž předcházela dostatečně účinný tepelný zásah, již nemá za následek enzymový rozklad glukosinolátů a část dosud přítomných nerozložených glukosinolátů je pak potravou přijímána. Při blanširování a vaření zelenin se značná část glukosinolátů vyluhuje, v průměru 30 – 40 %. Ve zmrazených zeleninách se v důsledku aktivity myrosinázy v poškozených pletivech nachází asi 50 % původně přítomných glukosinolátů. Při kvašení zelí dojde během prvního týdne fermentace k prakticky úplnému rozkladu glukosinolátů (Velíšek 2009).

Biologické účinky samotných glukosinolátů jsou prakticky indiferentní, i když produkty jejich degradace mohou ovlivnit organismus. Často jedna látka, která vzniká rozkladem glukosinolátu, vykazuje hned několik biologických účinků.

Rozkladem alifatických glukosinolátů vznikají slabě strumigenní isothiokyanáty, z nichž některé vykazují antimikrobní a insekticidní účinky (například allylisothiokyanát vzniklý ze sinigrinu). Dalšími produkty jsou nitrily a kyanopithioalkany, jež působí hepatotoxicky a nefrotoxicky. Silně strumigenní goitrin vznikající hydrolyzou progoitrinu inhibuje syntézu thyroïdních hormonů (thyroxin, trijodthyronin) a přenos jodu ve štítné žláze. Thiokyanátový anion, vznikající z nestabilních aromatických a indolových isothiokyanátů, vykazuje středně silnou strumigenní aktivitu, ovšem na rozdíl od goitrinu a isothiokyanátů působí kompetitivně ve vztahu k jodu. Oba mechanismy mohou vést ke zvětšení štítné žlázy (struma) a posléze i k poruchám její funkce (Velíšek 2009).

Kyanogenní glykosidy jsou zpravidla přítomny v buněčných vakuolách a β -glykosidáza, která štěpí cukerný fragment molekuly je uložena v cytosolu. Je třeba poznamenat, že pro β -glykosidázy je charakteristická selektivita vůči různým kyanogenním glykosidům. Zejména glykosidázy, které jsou aktivní při odbourávání aromatických kyanogenních glykosidů, jsou mnohem méně aktivní proti glykosidům s alifatickými aglykony (linamarin, lotaustralin).

Při enzymovém rozkladu amygdalinu vzniká v rostlinách z kyanovodíku jako produkt detoxikace L-3-kyanoalanin, který přechází na asparagin.

Zředěnými kyselinami za zvýšené teploty se kyanogenní glykosidy hydrolyzují na cukry a nitrily 2-hydroxykyselin. Z amygdalinu vzniká nitril D-mandlové kyseliny. V koncentrovaných kyselinách vznikají hydrolyzou nitrilů 2-hydroxykyseliny a amonné soli. Z amygdalinu takto vzniká D-mandlová kyselina (Velíšek 2009).

V slabě alkalickém prostředí dochází k epimeraci kyanogenních glykosidů. Z amygdalinu vzniká směs, která se nazývá isoamygdalin. Příslušný epimer amygdalinu odvozený od L-mandlové kyseliny, který se nazývá (S)-neoamygdalin, se v přírodě nevyskytuje. Produktem hydrolyzy amygdalinu v alkalickém prostředí je například epimerní směs genciobiosidu mandlové kyseliny, která se nazývá amygdalinová kyselina.

Kyanovodík uvolňovaný z kyanogenů je jedním z prekurzorů toxického ethylkarbamátu, který se vyskytuje hlavně v destilátech z peckového ovoce (Velíšek 2009).

Reakci kyanogenních glykosidů mohou ovlivnit vnější faktory. Teplota a pH ovlivňují reakce, které poskytují karbonylové složky a kyanovodík. Při alkalickém pH a teplotách vyšších než 60 °C je kyanogeneze rychlejší. Chirální kyanohydrinový uhlík v kyanogenních glykosidech může být epimerizován zředěnou bází (Coats et al. 2002). Hodnota pH má vliv jak na rychlost enzymové hydrolyzy (myrosinázy různých rostlin mají obvykle několik optim pH ležících v intervalu 5 – 8, což je dáno přítomností několika isoenzymů), tak na mechanismus degradace nestabilního aglykonu. Obecně vznikají v kyselém prostředí (pH < 4) převážně nitrily, zatímco při vyšším pH vzniká více isothiokyanátů (Velíšek 2009).

Pseudokyanogenní glykosidy se rozkládají jiným způsobem než kyanogenní glykosidy. V slabě alkalickém prostředí uvolňují kyanidy, mravenčany a elementární dusík, v kyselém prostředí formaldehyd, methanol a elementární dusík. Enzymovým rozkladem vzniká methylazoxymethanol (Velíšek 2009).

Toxicita kyanogenu je spojata s degradací amygdalinu.

3.2.2 Toxicita kyanogenních glykosidů.

Množství kyseliny kyanovodíkové produkované v kyanogenních rostlinách za vhodných podmínek se značně liší. Chemické studie volně rostoucích a kultivovaných kyanogenních rostlin na obsah kyseliny kyanovodíkové odhalují určitou závislost procesů kyanogeneze na věku rostlin a povaze místních ekologických podmínek, zejména půdy.

Štěpení probíhá v pletivech nějakým způsobem mechanicky poškozených, kdy se glykosidy a enzymy, dosud uložené odděleně, dostanou do vzájemného styku. Například v neporušených buňkách jetele plazivého je linamarin obsažen ve vakuolách, zatímco enzymy v buněčné stěně. Ke kontaktu substrátu s enzymy dochází po posečení rostlin, při drcení semen, žvýkání, působením ledových krystalků při pomrznutí, ale také při mimořádném suchu (Velíšek 2009).

Toxicita kyanogenních glykosidů a jejich derivátů závisí na uvolňování kyanovodíku a může vést k akutní otravě kyanidem. Byla také zapojena do etiologie několika chronických onemocnění. Zvýšená hladina kyanogenních glykosidů v dietě může z dlouhodobého hlediska způsobit akutní otravu kyanidem nebo oslabit nevratný neurologický stav (Bolarinwa et al. 2016).

Podstata působení kyanovodíku na teplokrevné živočichy spočívá v tom, že způsobuje rychlé udušení v důsledku blokování dýchacích enzymů a poruch funkcí tkání dýchacích cest. Všechny kyanidové sloučeniny schopné odštěpovat HCN a jsou schopny tvořit CN⁻ ionty. Pokud se kyanid dostane do těla, rychle se vstřebává a cirkuluje, poté se sloučí s methemoglobinem a vytvoří kyanomethemoglobin. Cirkulující kyanid inaktivuje cytochrom oxidázový enzym vázáním trojmocného železa (Fe³⁺), které je uvnitř tohoto enzymu. Enzym cytochrom oxidáza obvykle katalyzuje poslední krok oxidační fosforylace. Komplex enzym – kyanid brání provedení tohoto kroku. Z tohoto důvodu se enzym nemůže kombinovat s kyslíkem a transport elektronů je inhibován. Pacient nemá dostatek kyslíku a zastavení dýchání buněk nastává okamžitě. V důsledku tohoto procesu dochází k úmrtí v důsledku histotoxické anoxie (Yildiz et al. 2017).

Při akutní otravě HCN jsou postiženy nejprve respirační a vazomotorická centra (nejprve dochází k prohloubení dechu a zvýšení krevního tlaku, poté nastává paralýza dýchání a prudký pokles krevního tlaku). Kyanidy inhibují oxidační fosforylaci energetických procesů v nervových buňkách a také inhibují enzymy, které katalyzují biotransformaci řady AMK (histidin, tryptofan, tyrosin). Výrazné snížení schopnosti tkání spotřebovávat kyslík je indikováno šarlatovou barvou krve v žilách. V prvním okamžiku otravy je rozhodující kyslíkové hladovění tkání, následně se mohou objevit degenerativní změny v centrálním nervovém systému. V případě chronickému vystavení HCN hraje důležitou roli inhibice produkce hormonu štítné žlázy, která není způsobena HCN ale vznikajícími thiokyanáty. Citlivost organismu na akutní působení kyanidů je spojena s úrovní spotřeby kyslíku. Na nízké úrovni (například během hibernace) prudce roste rezistence k intoxikaci, což je obecně spojeno se snížením tělesné teploty a zvýšením rezistence vůči hypoxii.

Je-li člověk otráven může dojít k následujícím projevům. Při vysokých koncentracích CN⁻ v organosmu téměř okamžitě dochází ke ztrátě vědomí; nastává dýchací ochrnutí a brzy i ochrnutí srdce. Při nižších koncentracích lze rozlišit několik fází. Počáteční fáze zahrnuje následující projevy. Jedním z nich je pocit škrábání v krku. Další jsou pálivá hořká chuť v

ústech, slinění, znečitlivění úst a krku, spojivkové zarudnutí, slabost svalů, obtížné mluvení, závratě, akutní bolest hlavy, nevolnost, zvracení, nutkání k defekaci. Dýchání je poněkud zrychlené a poté prohloubené. Při vstupu čerstvého vzduchu v této fázi všechny příznaky rychle vymizí. Dále následuje stupeň dušnosti. Projeví se postupně zvyšující se celkovou slabostí, bolestí a pocitem napětí v srdci, objeví se vzácné a hluboké dýchání a zpomalení pulsu. Vzniká silná dušnost, někdy individuální krátké dechy, doprovázené dlouhými výdechy, nevolností, zvracením, rozšířenými zornicemi, exoftalmy. Poté nastává stupeň křečí. Vzniká zvýšená dušnost, nastává ztráta vědomí, těžké křeče (často tetanické). Dochází ke křečovým stahům žvýkacích svalů a skousnutí jazyka. Poslední je stupeň ochrnutí neboli asfyxie. Projeví v senzitivitu a reflexů, nedobrovolným močením a defekací. Dýchání je sníženo, stává se povrchní, následně dochází k smrti (Bandman et al. 1988).

U hospodářských zvířat je klinický obraz otravy kyanidem komplikován přítomností charakteristické trávicí mikroflóry. Účinnou β -glukosidázou je vybavena rovněž bachorová mikroflóra, například bakterie *Prevotella Ruminicola*. Přežvýkavci jsou proto vůči otravě rostlinnými kyanogeny citlivější než ostatní zvířata. U monogastrických zvířat dochází k částečnému štěpení kyanogenních glykosidů a k uvolnění kyanovodíku až působením mikroflóry tlustého střeva (glykosidázy mají optimální účinnost při pH 4,0 – 6,2, což neodpovídá trávicímu traktu monogastrů). Protože hydrolýza není úplná, část glykosidů se vstřebává v původní formě (Gusynin 1962).

Hlavní opatření pro záchranu života v případě otravy kyanidem jsou: (1) okamžitá léčba podáním 100% kyslíku, (2) ochrana dýchacích cest a (3) kardiopulmonální resuscitace. Léčba zahrnuje endotracheální intubaci u pacientů s kómou. Také je možné použít podávání antiepileptických léků v případě záchvatů, kontinuálního epinefrinu ve fázi pro korekci kardiiovaskulárního kolapsu a bikarbonátu sodného a neboť se předpokládá, že tato podpůrná léčba je účinná při otravě čistým kyanidem (Megarbane et al. 2013).

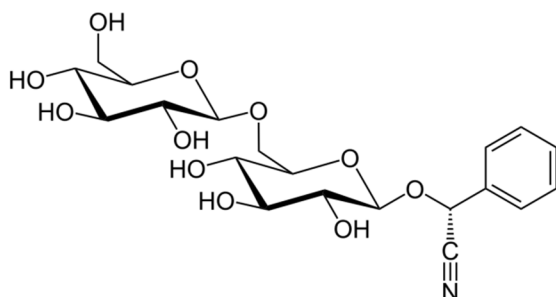
Při léčbě otravy kyanidem se používají také další látky, a to 1% roztok dusitanu sodného, 1% roztok methylenové modři, 25% roztok glukózy (úloha cukru je nejen v antitoxickém účinku, ale také v stimulačním účinku na intracelulární dýchání a stav kardiiovaskulárního aparátu). Existuje celá řada jiných látek (Gusynin 1962).

3.3 Amygdalin: vlastnosti a účinek na organismus teplokrevných živočichů, včetně lidí

Kyanogenní glykosidy, včetně amygdalinu, jsou přirozeně se vyskytující rostlinné toxiny. Amygdalin má rostlinný původ a je přítomen v semenech jader přibližně 800 rostlin. Primárně se amygdalin vyskytuje v rostlinách čeledi *Rosaceae*. Zástupci čeledi se vyskytují po celém světě, největší druhové bohatství je v severním mírném pásu. Je logické, že se tyto rostliny mohou objevit v krmivech zvířat a jsou zároveň konzumovány lidmi. Semena rodu *Prunus* jsou jedním z nejbohatších zdrojů amygdalinu, jedná se o semena hořkých mandlí, meruněk, třešní, broskví, švestek, nektarinek a jablek. Amygdalin obsahují také semena oliv, hroznů a pohanky. Letální dávkou je například cca 30 ks hořkých mandlí, nebezpečná může být již dávka 10 hořkých mandlí nebo jádérka z dvou kilogramů jablek (Anonym 2009).

Kromě amygdalinu jsou tato semena bohatá na bílkoviny, polynenasycené tuky a další živiny a obsahují až 2 procenta nebo více nitrilozidu (Salama et al. 2019).

Amygdalin patří do skupiny aromatických kyanogenních glykosidů. Aktivní formou amygdalinu je pravostranná struktura R-amygdalin, což je jeho přirozená forma.



Obrázek 9. Amygdalin

Kyanogenní glykosidy jsou uloženy ve vakuolách uvnitř rostlinných buněk. Při narušení tkání, například drcením, přicházejí kyanogenní glykosidy do styku s endogenními enzymy, což má za následek uvolnění kyanovodíku. V rostlinách proto kyanogenní glykosidy slouží jako důležité chemické obranné sloučeniny proti býložravcům.

Amygdalin je bílá krystalická látka s molekulovou hmotností $457,429 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Při zahřívání tvoří krystaly lehce hořké chuti, snadno rozpustné ve vodě a alkoholu, těžko rozpustné za chladu. Není rozpustný v diethyletheru. Bezvodý amygdalin taje při $215 \text{ }^\circ\text{C}$ a otáčí rovinu polarizovaného světla doleva: $[\alpha]_D - 40 \text{ }^\circ$.

Amygdalin poprvé izoloval v roce 1803 P.J. Robiquet a A. F. Boutron-Charlard. V roce 1830 byl zkoumán Justem von Liebig a Friedrichem. V roce 1950 vyvinul americký biochemik E. T. Krebs metodu syntézy látky velmi podobnou amygdalinu a dal jí název Vitamin B₁₇. Existuje také název Laertil.

Laertil označil spíše za vitamin nebo jako doplněk výživy než za lék. Ve skutečnosti se však omylem někdy označuje jako vitamin B₁₇, přestože sloučenina není vitaminem (Salama et al. 2019).

Amygdalin (D-mandelonitril-β-D-gentiobiosid), se skládá z cukerné složky tj. ze dvou molekul glukózy a aglykonu, tedy jedné molekuly benzaldehydu, který vyvolává analgetický účinek a z jedné molekuly kyseliny kyanovodíkové, která je jedovatá.

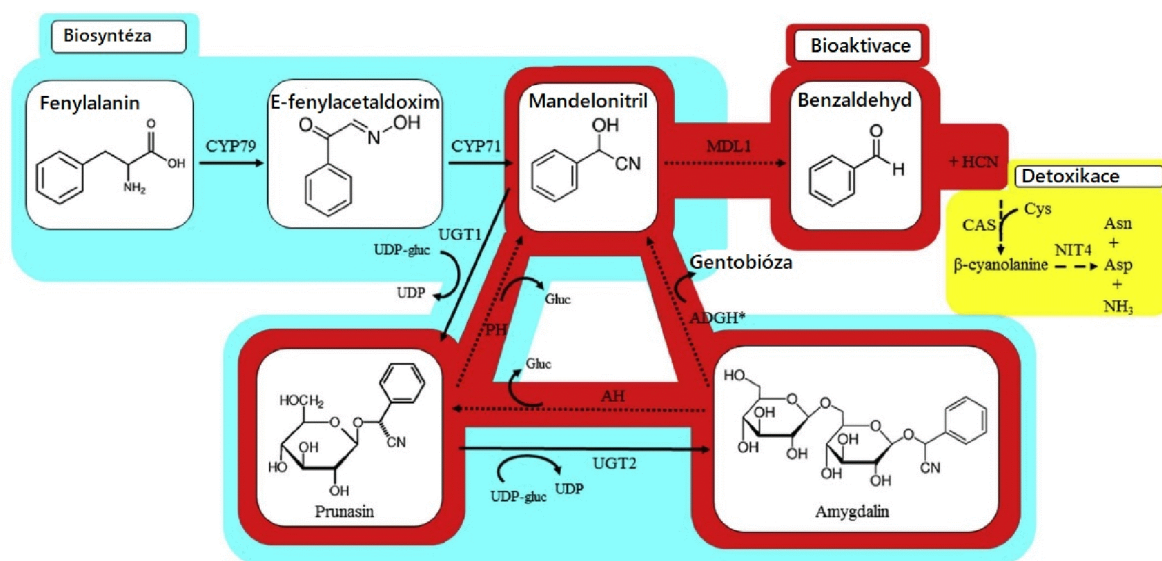
Benzaldehyd je nejjednodušší aromatický aldehyd s molekulovou hmotností $106,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, je to bezbarvá kapalina s charakteristickou vůní hořkých mandlí nebo semen jablek, při skladování žlutne a se oxidována atmosférickým kyslíkem na benzoylperoxid, který je výbušný. Ppzději přechází na benzoovou kyselinu. Zřetelný zápach látky je cítit při koncentraci $3 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$. V množství $100 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ způsobuje jediné vdechnutí podráždění nosní sliznice, desetinasobná expozice $0,15 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ způsobuje podráždění očí a horních cest dýchacích. Smrtelná dávka pro člověka je 50 – 60 g.

Kyanidy představují skupinu látek, pro kterou je charakteristický výskyt chemické skupiny sestávající z uhlíku a dusíku, které jsou spojeny trojnou vazbou ($\text{C}\equiv\text{N}$). Anorganické kyanidy obsahují vysoce toxický kyanidový ion CN^- , odvozený od kyseliny kyanovodíkové (HCN). Existují také kyanidy na organické bázi, kde se skupina $\text{C}\equiv\text{N}$ váže na další atom uhlíku jednoduchou vazbou (Buchancová et al. 2003).

Kyselina kyanovodíková je plyn nebo bezbarvá kapalina (bod varu je 25,6 °C, bod tání je 13,3 °C, hustota je 0,699 g.cm⁻³) se snadno mísí s vodou a s řadou organických rozpouštědel. Při teplotě -13,3 °C kyselina kyanovodíková ztvrdne a vytvoří vláknitou krystalickou hmotu. Kyselina kyanovodíková je slabá kyselina. I oxid uhličitý a slabé organické kyseliny vytěsňují kyselinu kyanovodíkovou ze solí. Ve volném stavu se kyselina kyanovodíková v přírodě nevyskytuje, avšak vyskytuje se ve formě chemických sloučenin, které zahrnují glykosidy (Kramarenko 2012). Kyanovodík je systémová chemická dusivá látka. Naruší normální využití kyslíku téměř každým orgánem těla. Expozice kyanovodíku může být rychle fatální. Má celotělové (systémové) účinky, zejména ovlivňuje ty orgánové systémy, které jsou nejcitlivější na nízkou hladinu kyslíku tj. centrální nervový systém (mozek), kardiovaskulární systém (srdce a krevní cévy) a plicní systém (plíce). Používá se komerčně pro fumigaci, galvanizaci, těžbu zlata, chemickou syntézu a výrobu syntetických vláken, plastů, barviv a pesticidů. Plynný kyanovodík má výrazný hořký mandlový zápach (jiní popisují zatuchlou „vůni starých tenisek“), ale velká část lidí není schopna ho detekovat. Zápach neposkytuje dostatečné varování před nebezpečnými koncentracemi. Má také hořkou pálivou chuť a často se používá jako roztok ve vodě (Hydrogen cyanide, CID=768).

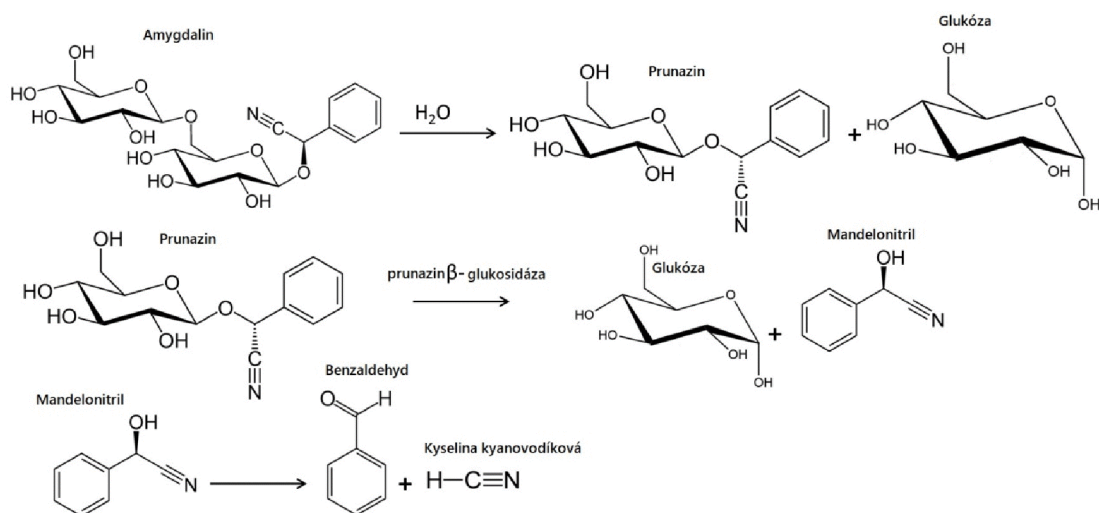
Cukerná složka se jmenuje genciobióza (také amygdalóza). Je to organická sloučenina, disacharid, který se skládá ze dvou zbytků D-glukózy spojených prostřednictvím β (1 \rightarrow 6)-glykosidových vazeb. Nachází se pouze ve sloučeninách v přírodě. Aglykon se naváže na cukernou složku prostřednictvím jedné molekuly kyslíku, proto amygdalin patří mezi O-glykosidy. V rostlinách se v této vázané formě ve formě glykosidů velmi často vyskytují přírodní sloučeniny s hydroxylovými skupinami. Mohou být extrahovány ze surovin za mírných podmínek beze změny a pokud se při zpracování surovin použije kyselá hydrolyza za vyšší teploty, je přirozené, že monosacharidy a aglykony budou nalezeny v individuálním stavu a lze pouze spekulovat o povaze glykosidu (Plemenkov 2001). Aglykony nebo α -kyanhydriny, jejichž vlastností je schopnost vylučovat kyselinu kyanovodíkovou enzymatickou hydrolyzou kyanogenních glykosidů, jsou tvořeny z odpovídajících aminokyselin. Nitrilová skupina je vytvořena z aminoskupiny, karboxylová skupina zůstává ve formě -COOH. D-glukóza se téměř vždy objevuje jako zbytek cukru, jehož glykosidická vazba má β -konfiguraci.

Biosyntéza amygdalinu začíná aminokyselinou L-fenylalaninem (Phe), který je N-hydroxylován a převeden na prunasin dvěma cytochromy P450 (CYP79 a CYP71) a UDP-glukosyltransferázou (UGT1) (Franks et al. 2008). V konečné fázi je prunasin přeměněn na amygdalin prostřednictvím další neznámé UDP-glukosyltransferázy (UGT2). Proces biosyntézy amygdalinu je uveden na obrázku 10 (Sánchez-Pérez et al. 2018).



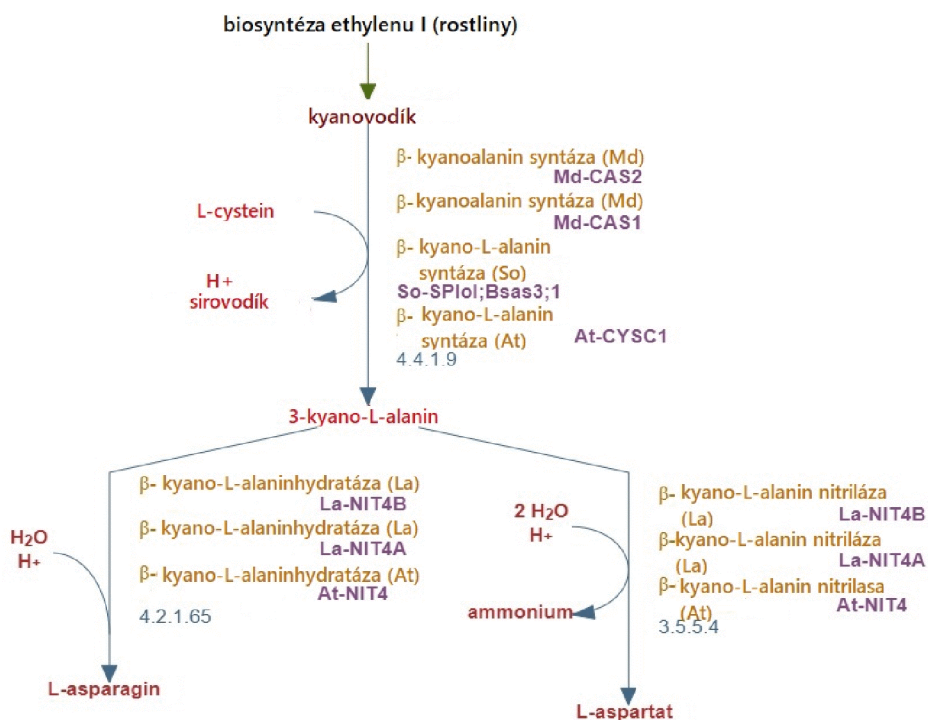
Obrázek 10. Biosyntéza amygdalinu

K bioaktivaci amygdalinu dochází pomocí enzymů. Amygdalin může být hydrolyzován amygdalin-hydrolázou za vzniku prunasinu a glukózy. Prunasin je následně hydrolyzován prunasin-hydrolázou, uvolňující mandelonitril a glukózu. Oba enzymy jsou β -glukosidázy, které patří do skupiny 1 glykosidových hydroláz (Del Cuetoa et al. 2018). Hydrolázy jsou skupinou enzymů, které katalyzují hydrolyzu kovalentních vazeb, kde činitelem rozkladu může být voda. β -glukosidázy katalyzují hydrolyzu β -glykosidických vazeb mezi cukernými složkami nebo mezi cukrem a aglykonem. Kyanogenní glukosidy a β -glukosidázy jsou lokalizovány v různých částech buňky. Pouze v případě, že je tkáň poškozena například napadením býložravci, jsou kyanogenní glukosidy bioaktivovány β -glukosidázami, přičemž se mimo jiné uvolňuje kyanovodík, jenž poskytuje okamžitou chemickou obranu proti býložravcům (Del Cuetoa et al. 2018). V posledním kroku mandelonitril-lyáza hydrolyzuje mandelonitril za vzniku benzaldehydu, který dává hořkou chuť a uvolňuje kyanovodík, který je toxický. Tento proces se nazývá kyanogeneze a mohou se ho účastnit jak některé rostliny tak i zástupci živočišní říše například hmyz. Proces kyanogeneze je uveden na obrázku 11.



Obrázek 11. Kyanogeneze

Kyanid je toxický pro všechny živé buňky a vyžaduje rychlou detoxikaci v rostlinných tkáních. Kyanid je detoxikován na 3-kyano-L-alanin, neproteinovou aminokyselinu, která je široce rozšířena ve vyšších rostlinách a je pro mnoho zvířat neurotoxická. Ve většině rostlin lze 3-kyano-L-alanin dále metabolizovat na L-asparagin a L-aspartát (Piotrowski et al. 2001). Tento metabolický proces je zobrazen na obrázku 12.



Obrázek 12. Proces detoxikaci amygdalinu v rostlinných tkáních

Činnost kyanid-detoxikační cesty je založena na nitrilazách a vede k současné produkci zdroje dusíku pro rostlinu. Tato cesta sestává z následujících dvou kroků: β -kyanoalanin syntáza katalyzuje reakci mezi HCN a L-cysteinem za účelem syntézy β -kyanoalaninu, vzniku amoniaku, L-asparagové kyseliny a L-asparaginu z H₂O a β -kyanoalaninu (Del Cueto et al. 2018).

Pokud amygdalin není pro rostliny jedovatou látkou a naopak pomáhá rostlinám prostřednictvím obranných mechanismů, nabízí se otázka, jak tato látka ovlivňuje teplokrevné živočichy. Nejviditelnějším účinkem na teplokrevné živočichy je možnost otravy kyanidem. Určitým nebezpečím je možnost otravy produktem hydrolýzy amygdalinu u domácích zvířat krmených rostlinami, které obsahují kyanogenní glykosidy.

Množství kyseliny kyanovodíkové produkované v kyanogenních rostlinách za vhodných podmínek se značně liší. Chemické studie volně rostoucích a kultivovaných kyanogenních rostlin sledujících obsah kyseliny kyanovodíkové odhalují určitou závislost procesu kyanogeneze na věku rostlin a povaze místních ekologických podmínek, zejména půdy. Existuje poměrně málo rostlin, které mohou vytvářet kyselinu kyanovodíkovou v prakticky významných množstvích. Například rostliny z rodu *Amygdalus* – mandloň nízká (*Amygdalus nana* L.) a v minulosti široce používané pastviny jako čirok (*Sorghum vulgare* Pers., *Andropogon sorghum* Brot.), soudánská tráva (*Sorghum sudanense* Stapf.), americký čirok (*Gumay*, *Sorghum halepense* Pers., *Andropogon halepense* Brot.) a medyněk vlnatý (*Holcus lanatus* L.), zblochan vodní (*Glyceria aquatica* Whlb.). Z volně rostoucích rostlin se jedná o bařičku přímořskou (*Triglochin maritima* L.). V ČR je to však extrémně vzácný a kriticky ohrožený druh. Jako halofyt v minulosti rostla na slaniscích, slatinách a černavách v suchých a teplých oblastech severozápadních Čech a jižní Moravy (Danihelka & Šmarda 2001).

Chronická intoxikace byla zjištěna u prasat krmených tepelně neupraveným maniokem, obsahujícím kolem 500 mg.kg⁻¹ kyanovodíku. O intoxikaci drůbeže je údajů jen velmi málo, užitečnost zřejmě klesá při obsahu HCN v krmivu vyšším než 100 mg.kg⁻¹ (Gusynin 1962).

Otrava zvířat se vyskytuje převážně při konzumaci čerstvých kyanogenních rostlin nebo špatně sušeného sena. Otravy jsou pozorovány také při krmení pokrutinami, plevami kyanogenních rostlin, jako jsou lněné pokrutiny, lněné plevy, podávané s velkým množstvím teplé vody. Použití suchých pokrutin nebo plev redukuje riziko otravy. Siláž z kyanogenních rostlin, za určitých podmínek její produkce, může také představovat riziko otravy zvířat.

Letální dávka kyseliny kyanovodíkové pro teplokrevná zvířata je 1 mg.kg⁻¹ tělesní hmotnosti. Pro koně s průměrnou hmotností může být 0,4 až 0,5 g čisté kyseliny kyanovodíkové fatální. Dojnice jsou relativně méně citlivé na působení kyseliny kyanovodíkové, letální dávka pro průměrnou dojnici je poněkud vyšší než dávka uvedená pro koně. Ovce hynou po požití 0,1 g kyseliny kyanovodíkové. Pokud je obsah kyseliny kyanovodíkové v rostlině 0,02 %, množství krmiv asi 2 kg při rychlé konzumaci a při absenci podmínek bránících tvorbě kyseliny kyanovodíkové může způsobit smrtelnou otravu koně nebo dojnice. 500 g takových rostlin může otrávit ovce (Gusynin 1962).

Zvířata často umírají během několika hodin, v některých případech dokonce i několika minut. Kvůli nedostatku kyslíku mění polohu těla, zaujímají pozice, které pomáhají zachytit

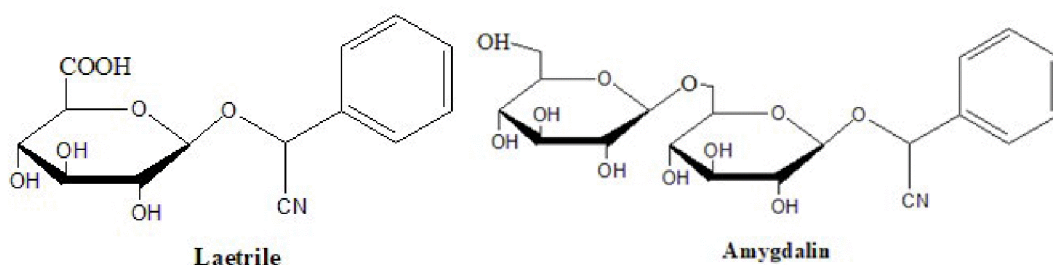
více čerstvého vzduchu, dojnice při dýchání zvedají hlavu a protahují si krky, otáčejí hlavou k větru. Prasata sedí v pozici psa a tím mají horní část těla volnější pro dýchání.

K léčbě otravy kyanidem se aplikují následující látky, které byly prakticky odůvodněny: 1% roztok dusitanu sodného (skot 200 – 400 ml, malý skot 10 – 20 ml), 1% roztok methylenové modři (skot 100 – 200 ml), 25% roztok glukózy v dávce 500 – 600 ml pro skot. Prasatům je podáván 10 – 30% roztok thiosíranu sodného v dávce až 30 ml nebo směs 1% roztok methylenové modři s 1,8% roztokem síranu sodného v dávce 100 ml (Gusynin 1962). Existují celá řada dalších látek, například sůl k lizu s obsahem až 5 – 10 % síry může být dobrým profylaktickým činidlem.

3.3.1 Amygdalin a jeho možné protirakovinné vlastnosti

Pod obchodním názvem „Laetrile“ je amygdalin propagován zástupci „alternativní medicíny“ jako léčivo podobné vitamínu pod označením B₁₇ a protirakovinné činidlo. V této funkci byl amygdalin kategoricky odmítnut vědeckou a lékařskou komunitou, zejména Americkou správou potravin a léčiv (FDA), Americkou onkologickou společností, Americkou lékařskou asociací (AMA) jako toxický a bez antitumorových účinku. Jsou známy případy otravy „laetrem“, včetně případů, kdy ji laetril užíván v kombinaci s vysokými dávkami vitamínu C, což snižuje hladinu cysteinu v tkáních, která váže kyanovodík *in vivo* (Bromley et al. 2005). Reklama na amygdalin jako protirakovinného činidla je považována za klasický a jeden z nejziskovějších příkladů využívání obav lidí o své zdraví.

Ačkoli laetril a amygdalin jsou kyanogenní glykosidy, jedná se o různé látky. Přírodní amygdalin existuje jako pravostranná struktura (R-amygdalin), která je aktivní formou. Název „Laetril“ je zkratkou, která je odvozena ze slov „laevorotatory a mandelonitrile“. Laetril, který je předmětem amerického patentu, je polosyntetický derivát, jehož struktura je D-mandelonitril-β-glukóza, liší se však od struktury amygdalinu (D-mandelonitril-β-gentiobiosid), který je syntetizován v Mexiku. Na obrázku 13 jsou rozdíly v chemických strukturách amygdalinu a laetrilu (Salama et al. 2019).



Obrázek 13. Laetril a amygdalin

Otázka protirakovinné aktivity amygdalinu/laetrilu zůstává otevřená. Protože vědci mají stále odlišné názory na protinádorový účinek amygdalinu.

Společně ji též zařazení amygdalinu do skupiny vitamínů B pod názvem B₁₇.

Pod vitamínem se rozumí látka, která odpovídá následujícím charakteristikám:

- jedná se o organickou látku

- je to látka absolutně nutná pro životně důležité funkce (s nedostatkem se vyvíjí charakteristický klinický obraz)
- tělo si ji nedokáže vyrobit v požadovaném množství
- je požadována v minimálních množstvích
- je obsažena v potravinách

Hlavním úkolem vitaminů skupiny B je účast v koenzymech v mnoha enzymatických procesech, především v neustálé obnově živé hmoty. S jejich nedostatkem dochází ke snížení aktivity některých enzymů, a tím k inhibici specifických metabolických procesů. V případě B-avitaminózy experimentální zvířata vykazují významné poškození reprodukční funkce, což je v souladu s dobře známou skutečností o účasti enzymů na řízení jednotlivých fází reprodukčního procesu. Vitamíny skupiny B jsou mírně odlišné ve svých chemických vlastnostech a biologických mechanismech účinku.

B₁ – thiamin. Podporuje přeměnu cukrů, tuků a bílkovin na energii. Je obsažen ve skořápkách obilných zrn, v černém a bílém chlebu z celozrnné mouky, v zeleném hrášku, v pohance a ovesné kaši.

B₂ – riboflavin. Účastní se všech typů metabolických procesů. Hraje zvláště důležitou roli při zajišťování vizuálních funkcí, normální pokožky a sliznic a syntéze hemoglobinu. Nachází se v masných výrobcích, kuřecích vejcích, játrech, ledvinech, droždí, mandli, houbách, brokolici, zelí, pohance, rafinované rýži, těstovinách a bílém chlebu.

B₃ (PP) – nikotinová kyselina. Podílí se na uvolňování energie ze všech kalorických živin, dále na syntéze proteinů a tuků. Nachází se v žitném chlebu, ananasu, mangu, řepě, pohance, fazolách, mase, houbách, játrech a ledvinách.

B₅ – pantothenová kyselina. Podílí se na syntéze obranných látek, urychluje hojení ran. Nachází se v hrachu, kvasnicích, lískových oříšcích, zelené listové zelenině, pohance, ovesných vločkách, květáku, česneku, ledvinách, srdci, kuřatech, žloutcích, mléce a rybím kaviáru. V těle je také syntetizován střevní mikroflórou.

B₆ – pyridoxin, pyridoxal a pyridoxamin. Podílí se na procesech metabolismu cukrů, syntéze hemoglobinu a polynenasycených mastných kyselin. Regulují činnost nervového systému, regenerují červené krvinky. Nachází se v klíčcích z obilovin, vlašských ořechů a lískových ořechů, ve špenátu, bramborách, mrkvi, květáku a zelí, rajčatech, jahodách, višních, pomerančích a citronech, obilovinách a luštěninách, masu a mléčných výrobcích, rybách, játrech, vejcích. V těle je syntetizován těž střevní mikroflórou.

B₇ (H) – biotin. Pomáhá uvolňovat energii z vysoce kalorických sloučenin. Malá množství biotinu se nacházejí ve všech výrobcích, ale většina tohoto vitamínu se nachází v játrech, ledvinách, kvasnicích, luštěninách (sója, arašídech), květáku a ořechů. V menší míře se vyskytuje v rajčatech, špenátu, vejcích (nikoli syrových), v houbách. Zdravá střevní mikroflóra syntetizuje biotin v množství dostatečném pro tělo.

B₉ (Bc, M) – listová kyselina. Podporuje tvorbu nukleových kyselin a dělení buněk, tvorbu červených krvinek, vývoj plodu, metabolismus homocysteinu, vývoj imunitního a oběhového systému, je nezbytný pro růst organismů. Nachází se v listové zelenině, v některých citrusových plodech, v luštěninách, v chlebu z celozrnné mouky, kvasinkách a játrech. Je součástí medu a je také v těle syntetizována střevní mikroflórou.

B₁₂ – kyanokobalamin. Podporuje tvorbu červených krvinek, růst a činnost nervového systému. Je obsažen výhradně v produktech živočišného původu, například, játrech, žloutku a fermentovaných mléčných výrobcích (Liflandský 2006).

Mezi vitaminy skupiny B byly zařazeny i další látky, ale nesplňují všechny podmínky kladení na vitaminy.

B₄ – adenin, cholin nebo karnitin. Je to důležitá látka pro nervový systém, zlepšuje paměť a reguluje hladinu inzulínu v těle.

B₈ – inositol. Snižuje hromadění tuku v játrech, obnovuje strukturu nervové tkáně, působí jako antioxidant a antidepresivum. Normalizuje spánek a léčí pokožku. Je produkován samotným tělem.

B₁₀ (H₁) – para-aminobenzoová kyselina. Aktivuje celou střevní mikroflóru, podílí se na asimilaci bílkovin a na tvorbě červených krvinek, podporuje zdraví pokožky (Liflandský 2006).

Někteří vědci tvrdí, že B₁₇ je chybějící vitamin, který tělo potřebuje k obnovení zdraví. Tato teorie však předpokládá, že rakovina je metabolická porucha způsobená nedostatkem vitamínu. Přes experimentální studie, které naznačují, že úroveň příjmu jednotlivých vitaminů může ovlivnit vývoj rakoviny, neexistuje důkaz, že laetril je nezbytný pro normální metabolismus (Salama et al. 2019). Kromě toho amygdalin nesplňuje všechny podmínky pro to, aby mohl být nazýván vitamínem. To však nevylučuje skutečnost, že tato látka může mít v jistém smyslu pozitivní vliv na lidský organismus.

Skupina čínských vědců aktivně studuje vlastnosti amygdalinu. Amygdalin se používá v tradiční čínské medicíně a studie vědců tvrdí, že tato látka úspěšně pomáhá při léčbě rakoviny (Lea & Koch 1979; Xing & Yang 2003; Chen et al. 2013).

Li et al. (2019) píše, že β-glukosidáza je enzym, který uvolňuje glukózu hydrolýzou glykosidické vazby mezi cukry a arylovými skupinami. Interakce mezi cukry a arylovými skupinami indukuje vznik β-glukosidázy, která současně inhibuje oxidázu cytochromu c, jež je koncovým enzymem mitochondriálního respiračního řetězce, a tím se ukončuje syntéza adenosintrifosfátu. Celý proces vede k buněčné smrti v důsledku vzniku velkého množství kyseliny kyanovodíkové. Normální buňky obsahují enzym rhodanázu pro přeměnu kyseliny kyanovodíkové (CN⁻) na netoxickou kyselinu thiokyanatou (SCN⁻), která v nádorových buňkách chybí, a proto může být kyselinou kyanovodíkovou nádorová buňka specificky zničena. Pro aktivaci enzymu rhodanázy v těle teplokrevného živočicha, včetně člověka, je však nutná expozice z vnějšku, tj. přítomnost antidota. Tím je látka thiosulfát. To je v rozporu s údajem Jamesa (2002) podle něhož nádorové i normální buňky obsahují pouze stopy β-glukosidáz a stejná množství rhodanázy.

Li et al. (2019) naznačují, že vztah mezi β-glukosidázou a amygdalinem by mohl vyvolat specifický protinádorový účinek. Kyselina kyanovodíková může působit nespecificky na buněčný cyklus, a tím zabíjet rakovinné buňky. Když je β-glukosidáza spojena s monoklonální protilátkou specifickou pro nádor, může být amygdalin přeměněn na aktivní lék, který specificky usmrcuje nádorové buňky.

Todorova et al. (2017) vyčlenili alkylační činidlo methylnmethansulfonát (MMS) jako standardní mutagen pro studium možného antimutagenního účinku amygdalinu. Jejich studie zjistila, že amygdalin neměl negativní ani jiný účinek na mutagenní a rekombinační procesy v buňkách. Současně byl pozorován nedostatek toxického účinku amygdalinu ve zdravé lidské

buněčné linii, zatímco toxicita byla stanovena pro nádorové buněčné linie, což ukazuje na vysokou selektivitu amygdalinu vůči nádorovým buňkám.

Li et al. (2019) dále zjistili, že benzaldehyd, produkt amygdalinu rozložený enzymy, může inhibovat aktivitu pepsinu a je účinný při chronické atrofické gastritidě, která snadno přechází do rakoviny žaludku. Tyto výsledky naznačují, že určitá koncentrace amygdalinu může selektivně zabíjet nádorové buňky v těle působením β -glukosidázy s nevýznamnými klinickými nepříznivými účinky a že amygdalin může generovat kyselinu kyanovodíkovou působením lidské β -glukosidázy a konkrétně zabíjet nádorové buňky.

Existuje teorie, která naznačuje, že kyanid uvolňovaný z laetrilu zvyšuje kyselý obsah nádorových buněk, což vede k narušení lysozomů uvolňujících jejich obsah. Tím se zastaví růst nádoru a ničí se rakovinné buňky. Podle této teorie je dalším důsledkem destrukce lysozomů stimulace imunitního systému. Kromě toho by amygdalin mohl výrazně snížit účinek enzymu telomerázy, který se vyskytuje ve vyšších hladinách v rakovinných buňkách, a to 8 – 13 krát vyšší. V důsledku toho se snižuje exprese telomerasové reverzní transkriptázy a složky RNA telomerázy, což vede k potlačení růstu rakovinných buněk (Salama et al. 2019). Také například Moon et al. (2015) považují aplikaci amygdalinu za účinnou léčbu rakoviny.

V souvislosti s účinkem amygdalinu na tumorové buňky je nutno se zmínit o Warburgovi efektu. Warburgův efekt je tendence většiny rakovinných buněk produkovat energii hlavně prostřednictvím velmi aktivní glykolýzy s následnou tvorbou mléčné kyseliny, a nikoli prostřednictvím pomalé glykolýzy a oxidace pyruvátu v mitochondriích pomocí kyslíku jako ve většině zdravých buněk. V buňkách rychle rostoucího zhoubného nádoru je rychlost glykolýzy téměř 200krát vyšší než ve zdravých tkáních. V tomto případě zůstává glykolýza výhodná i za podmínek, kdy je nadbytek kyslíku (Alfarouk et al. 2011).

Hlavním toxickým účinkem na rakovinnou buňku je působení kyseliny kyanovodíkové nebo od ní odvozeného kyanidového iontu, který blokuje oxidační fosforylaci v mitochondriích. Kyanidový ion, který má afinitu k trojmocnému železu, blokuje cytochromoxidázu, tj. nejdůležitější mitochondriální enzym obsahující železo, který katalyzuje konečný stupeň oxidační fosforylace. Výsledkem je, že syntéza molekul 36 ATP je v buňce náhle zastavena. Z tohoto důvodu se tkáňové dýchání přerušuje a rychle dochází ke smrti buněk, primárně centrálního nervového systému, jako nejcitlivějšího systému na nedostatek kyslíku. Zbývající neporušená anaerobní glykolýza, která vede pouze k 2 molekulám ATP, nemůže poskytnout buňkám dostatečné množství energie, proto při akutní otravě kyanidem dochází k rychlé smrti. Rakovinné buňky potřebují ale mnohem méně kyslíku, protože jejich hlavním zdrojem energie je intenzivní proces glykolýzy, proto je velmi problematické způsobit smrtelné otravy kyanidy v přítomnosti nádorových buněk.

V současné vědecké literatuře jsou ve velké míře popisovány výhody amygdalinu v léčbě rakoviny (Makarević et al. 2014; Milazzo & Horneber 2015; Abboud et al. 2018). V pracích z let 1970 – 2000 jsou naopak uvádějí argumenty proti protinádorové aktivitě amygdalinu a zejména laetrilu (Lehmann 1977; Biaglow & Durand 1978; Moertel et al. 1982).

Kromě toho klinické studie na lidech nepotvrzují účinnost laetrilu. Milazzo et al. (2007) píše, že systematický přehled jakýchkoli typů klinických důkazů souvisejících s účinností nebo bezpečností laetrilu (nebo intervencí amygdalinu) u pacientů všech věkových skupin trpících rakovinou jakéhokoliv typu nebo stádia, nenalezl žádný spolehlivý důkaz, že

laetril je účinný jako protirakovinový agens. Tvrzení, že laetril má protirakovinné účinky, proto není podloženo údaji z kontrolovaných klinických hodnocení. V malém počtu zpráv se však předpokládá, že laetril je přínosem pro pacienty s rakovinou. Je třeba ovšem zdůraznit, že v nejlépe hodnotících studiích a zprávách není znám počet léčených případů, proto tyto typy přehledů mohou generovat falešně pozitivní celkový dojem. Všechny pozitivní výsledky pocházely ze studií, kde subjektivní reakce mohly být chybně interpretovány jako objektivní důkaz účinnosti. Mnoho případů uvádějících regresi nádoru odkazovalo na dočasnou regresi a v případech údajné úplné remise žádná ze studií neposkytla podrobné informace o následném stavu. Někteří pacienti, u kterých došlo k regresi nádoru, mohli také podstoupit konvenční léčbu.

Ve studiích z poslední doby protinádorové účinky amygdalinu byly prokázány *in vitro* bez experimentů *in vivo*. Kromě toho, amygdalin v dávkách, které byly použity, vyvolal málo klinických vedlejších účinků. Bylo zjištěno, že hladina kyanidu vzrostla na $2,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v krvi jedinců, kteří podstoupili orální léčbu amygdalinem (0,5 g), aniž by vykazovali významné známky nepohodlí a všechny ostatní parametry měli v normě. Pouze u jednoho pacienta se objevily příznaky otravy kyanidem v důsledku podání nadměrné dávky amygdalinu (1,0 g). U tohoto jedince dosáhla hladina kyanidu v krvi $3,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tato studie ukázala, že amygdalin je bezpečný pro pacienty s pokročilým karcinomem (Li et al. 2019).

Na základě analýzy dostupné literatury ji zřejmé, že je potřeba mnohem více studií k objasnění farmakologických mechanismů amygdalinu, pokud jde o optimální dávku, proveditelnost kombinovaného použití amygdalinu s jinými protinádorovými léky a dokonce i laboratorní syntézu aktivní složky v amygdalinu, za účelem posílení jeho protinádorového účinku a snížení jeho nepříznivých účinků pro klinické použití.

Stojí za zmínku, že i přes protichůdné výsledky existujících experimentů a studií je amygdalin rozhodně zajímavý nejen pro farmakologický ale i pro potravinářský průmysl, protože amygdalin se nachází v rostlinách, které lidé používají k jídlu nebo hospodářská zvířata dostávají v krmné dávce.

3.3.2 Složení jablečných semen

Jedním z úkolů této bakalářské práce bylo analyzovat semena vybraných odrůd jablek pěstovaných v České republice na přítomnost amygdalinu. HPLC analýza je pro daný úkol nejvhodnější, protože chemické složení semen jablek ji poměrně komplikované a tento typ analýzy umožňuje oddělit jednotlivé chemické látky od sebe navzájem.

Jablka jsou jedním z nejpobulárnějšího ovoce na světě. Jabloně se pěstují ve většině mírných oblastí. Mezi všemi ovocnými stromy mírných zeměpisných šířek má jablň první místo, pokud jde o plochu výsadby a výnos. Produkce jablek v ČR je v rámci celého ovocnářství nejdůležitější. Jak uvádí Ministerstvo zemědělství v „Situční a výhledové zprávě“ za rok 2018, jablka ze sklizně roku 2017 tvořila 82 % veškeré produkce ovoce a na tržbách ovocnářských podniků se podílela 63 % (Buchtová 2018). V roce 2018 se však tento podíl snížil na 49,5 %, avšak procent veškeré produkce zůstal stejný. Jablka jsou významnou komoditou, jejíž rentabilita je přímo úměrná rentabilitě celého ovocnářství. Z těchto důvodů je nutné jablka považovat za hlavní a citlivou komoditu sektoru ovocnářství (Buchtová 2018).

Celková sklizeň jablek v ČR se v roce 2018 zvýšila v porovnání s rokem 2017 až o 46 % na 253,4 tisíc tun. Celkové tržby za ovoce z těchto sadů činily 1,2 mld. Kč, což je v porovnání s rokem 2018 pokles o 19 %. To svědčí o vyšším podílu jablek na zpracování (Buchtová 2019). Během zpracování jablek může dojít ke kontaminaci výrobků, včetně kontaminace amygdalinem.

Jablka lze konzumovat syrová nebo zpracovaná na alkoholické (sider) nebo nealkoholické nápoje (mošt, džus) nebo jablečnou omáčku.

V semenech jablek bylo detekováno čtyřicet šest sloučenin, z nichž většina byla mastnými kyselinami, stanovenými jako jejich methylestery. Linolová kyselina byla nejvíce zastoupenou mastnou kyselinou, následovaná palmitovou, linolenovou, stearovou a olejovou kyselinou. Menší množství kyselin mezi 0,2 % a 4 %, tvořily eikosanová, dokosanová, hexanová, oktanová a heptadekanová kyselina. Některé mastné kyseliny byly také detekovány jako přírodní ethyl-, butyl- a hexylestery, i když jsou zastoupeny v malém množství ve srovnání s volnými kyselinami. Linolová kyselina včetně jejích esterů tvořila 51,2 % celkové těkavé frakce hexanového extraktu. V semenech byl také přítomen skvalen a nonakosan (3,4 % respektive 3,6 %), které tvořily dvě hlavní složky frakce jiných než mastných kyselin. Semena také obsahovala fruktózu, glukózu a sacharózu v poměru přibližně 2,5 : 2 : 1 (Yinrong Lu & Yeap Foo 1998). Získaná polární frakce obsahovala dvě hlavní sloučeniny, amygdalin a florizin, přičemž phlorizin tvořil přibližně 75 % celkových polyfenolů, poté následovaly floretin-2'-xylo-glukosid (cca 9 %) a quercetin-3-galaktosid (cca 6 %). Málo zastoupenými složkami, které byly detekovány, jsou chlorogenová a p-kumarylchinová kyselina, 3-hydroxyfloridzin, floretin-2'-xyloglukosid a šest kvercetinových glykosidů, a to arabinosid, galaktosid, glukosid, rhamnosid, rutinosid a xylosid (Yinrong Lu & Yeap Foo 1998).

3.3.2.1 Amygdalin v jablkách

Ačkoli jablka jsou bohatým zdrojem vitamínů a dalších živin, jablečná semínka obsahují vysoké hladiny kyanogenních glykosidů. Obsah amygdalinu v jablečných semenech se pohyboval od 1 do 4 mg.g⁻¹, zatímco obsah kyanogenních glykosidů v džusu byl v rozmezí 0,001 – 0,08 mg.ml⁻¹ (Bolarinwa et al. 2016).

Obsah amygdalinu v jablkách může být ovlivněn několika faktory. Pokud jsou potraviny vyrobené z kyanogenních rostlin skladovány při pokojové teplotě (35 ± 2°C) obsah kyanidů je stálý. Při nízké teplotě (26 °C) obsah kyanidů v potravinách klesá. Kyanogenní glykosidy jsou obecně rozpustné ve vodě. Během vaření se značné množství kyanogenních glykosidů vyluhuje do vody na vaření. Několik studií (Ferreira et al. 1995) popisují snížení obsahu kyanidu ve vařených výrobcích. Pokud zvolený způsob zahrnuje zahřívání za sucha, tepla nebo při nízkém obsahu vlhkosti, je příjem kyanogenních glykosidů z vařených potravin omezen pouze na malé množství. Snížení obsahu kyanidů by mohlo být také důsledkem rozmanitosti, zralosti a velikosti produktů (Bolarinwa et al. 2016).

3.3.2.2 Obsah amygdalinu v rostlinách

Amygdalin se nachází v různých rostlinách ve většině případů v semenech. Obsah amygdalinu v jablečných semenech se pohybuje od 1 do 4 mg.g⁻¹, zatímco obsah amygdalinu v jablečné šťávě byl uváděn v rozmezí 0,001 až 0,08 mg.ml⁻¹ (Bolarinwa et al. 2016). Semena zralé broskve obsahují v průměru 2,4 mg.g⁻¹ amygdalinu (Lee SH et al. 2017). Amygdalin byl také detekován v jádrech jiných ovocných stromů, jako jsou švestka (4100 mg.100⁻¹ g), meruňka (2394 mg.100⁻¹ g) a třešeň (2306 mg.100⁻¹ g). V hořkých mandlových jádrech byly stanovené hladiny amygdalinu vyšší, a to 5808 mg.100⁻¹ g sušiny (Corradi & Micheli 1982; Shahidi & Wanasundara 1997). Nejvyšší obsah amygdalinu 926 mg.100⁻¹ g v sušině byl stanoven v hořké odrůdě *Sassari 11*. Naopak ve sladké odrůdě mandlí *Arrubia* bylo stejnými autory stanoveno ve 100 gramech sušiny pouze 106 mg amygdalinu a v další sladké odrůdě *Texas* nebyl dokonce žádný amygdalin detekován (Usai & D'hallewin 1992). Ve sladkých odrůdách mandlí byly tedy obsahy amygdalinu nižší než v semenech dalších rostlin čeledi *Rosaceae*.

V tabulce 2 jsou uvedeny některé vybrané rostliny čeledi *Rosaceae*, jejichž plody jsou člověkem používány jako potrava a obsahují amygdalin, včetně jeho obsahu.

Tab. 2. Obsah amygdalinu v plodech rostlin čeledi *Rosaceae* (Manyakhin & Koldaev 2019).

Druh rostliny	Obsah amygdalinu [% podíl sušiny extrakčních látek]
Hořké mandle (<i>Amygdalae amarus L.</i>)	3
Střemcha obecná (<i>Prunus padus</i>)	1,65±0,15
Meruňka obecná (<i>Prunus armeniaca</i>)	1,44±0,12
Švestka domácí (<i>Prunus domestica</i>)	1,02±0,08
Višeň obecná (<i>Prunus cerasus</i>)	0,80±0,06
Višeň plstnatá (<i>Prunus tomentosa</i>)	0,12±0,01

Údaje v tabulce 3 odpovídají obsahu HCN vznikajícího z některých vybraných kyanogenních rostlin, které lidé konzumují jako potravu, a také používají pro krmení domácích zvířat. Z tabulky je zřejmé, že nejvíce kyanovodíku vzniká ze špiček nezralých výhonků, které jsou následovány peckami višní.

Tab. 3. Obsah HCN v kyanogenech některých rostlin (Velíšek 2009).

Původ	HCN [mg.kg ⁻¹ čerstvého materiálu]	Původ	HCN [mg.kg ⁻¹ čerstvého materiálu]
maniok jedlý (Kassava)		peckové ovoce	
listy	650-1040	hořké mandle	2800-3100
celé hlízy	550	meruňkové pecky	3200
kůra hlíz	840-2450	višňové pecky	3540
dřeň hlíz	100-330	dužnina višni	10
bambus		čirok obecný	
nezralé stonky	3000	mladé listy	600
špičky něžralých		klíčící rostliny	2400
výhonků	8000	luštěniny	
mučenka purpurová		fazol měsíční (semena)	100-4000
nezralé ovoce	700	fazol obecný (semena)	20
zralé ovoce	100	hrách setý (semena)	23
len setý (semena)	200-380		

3.4 Metody stanovení amygdalinu

3.4.1 Metody extrakce amygdalinu

Extrakce chemických sloučenin z rostlinného materiálu je pracný proces. Jedním z hlavních zdrojů chyb, ke kterým dochází během analytického postupu, je fáze přípravy vzorku. Protože tato fáze určuje dobu analýzy, je nezbytné zkrátit postup a zvýšit jeho přesnost a selektivitu při identifikaci většiny chemických sloučenin. Za účelem oddělení analytů od pevných vzorků jsou nejčastěji používanými rozpouštědly s nízkým zahříváním a nízkými body varu. Rozpouštědla musí být také netoxická, nehořlavá a chemicky neutrální a neměla by negativně ovlivňovat instrumentaci a stabilitu analyzovaných látek. Obvykle se používají rozpouštědla, jako jsou methanol, ethanol, aceton, ethylacetát a jejich směsi s vodou (Arceusz et al. 2013).

Extrakce je první fází procesu vedoucího k izolaci sekundárních metabolitů z rostlinných materiálů. Soxhletova extrakce je klasická metoda používaná pro tento účel. Tato metoda zajišťuje vícenásobnou digesci rostlinného materiálu a nepřetržitou extrakci, zatímco se dodává nový podíl rozpouštědla. Díky tomu je zachován největší rozdíl mezi koncentracemi analytu v analyzovaném materiálu a rozpouštědle, což vede k úplné extrakci rostlinného materiálu (Arceusz et al. 2013).

Hlavní nevýhody Soxhletovy extrakce spočívají v tom, že se jedná o časově náročný proces za použití nákladných rozpouštědel, která musí být odpovídající kvality. Z těchto důvodů byly v posledních letech preferovány jiné metody, které jsou méně časově náročné a vyžadují menší objemy rozpouštědel (Rajaei et al. 2010). Mezi tyto metody patří extrakce superkritickou tekutinou (SFE), extrakce ultrazvukem (UAE), a zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE).

Extrakce pomocí ultrazvuku (UAE) je založena na působení ultrazvukových vibrací zaměřených na extrahovaný vzorek, což zvyšuje účinnost penetrace vzorku rozpouštědlem. Tato metoda se vyznačuje vysokou rychlostí, jednoduchostí a obvykle trvá několik minut. Kromě typu rozpouštědla, velikosti vzorku, pH extraktu, teploty a tlaku mají vliv na účinnost extrakčního procesu také velikost částic, doba trvání sonifikace a jeho amplituda (Kagan 2011). Bez ohledu na tyto činitele ovlivňující extrakci je metoda považována za nejjednodušší možnou v laboratoři. Jednou z jejích výhod je možnost provádět extrakci několika vzorků současně v relativně krátké době. Je však nutné extrakt dekantovat nebo filtrovat přes vhodné papírové filtry. Neprůhledný roztok po extrakci by se totiž mohl zachytit na koloně HPLC. V praxi dochází během procesu UAE k narušení buněčných stěn rostlin, což umožňuje účinnou extrakci metabolitů obsažených v buňkách (Arceusz et al. 2013).

Zrychlená metoda extrakce rozpouštědlem (ASE) je relativně nová technika vyvinutá a distribuovaná hlavně společností Dionex (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA). V literatuře existují alternativní názvy pro tuto techniku, jako je extrakce tlakovou tekutinou (PFE) a extrakce tlakovou kapalinou (PLE).

Doba extrakce je krátká, v rozmezí 5 – 15 min. V technice ASE se používají stejná rozpouštědla jako v klasických metodách, ale aplikuje se vyšší tlak (přibližně 3,3 – 20,3 MPa) a zvýšená teplota, přibližně 40 – 200 °C. Vzorek extrahovaný touto technikou se umístí do extrakční nádoby vyrobené z nerezové oceli. Základní výhody ASE jsou možnost extrahovat vzorky s vysokou vlhkostí, krátká doba extrakce, lepší penetrace vzorku rozpouštědlem, dobrá kinetika extrakce, automatizace procesu a relativně snadné použití přístrojové techniky (Garcia-Salas et al. 2010).

Extrakce superkritickou tekutinou (SFE) často předchází analýze pomocí HPLC. Extrakce superkritickou tekutinou je moderní technika, která má oproti klasickým metodám extrakce mnoho výhod. Mezi ně patří „nízké teploty, což je pozitivní rys v případě analýzy tepelně labilních sloučenin. Dalšími výhodami jsou vysoká selektivita, významné snížení objemu rozpouštědla použitého pro extrakci, nízká hmotnost vzorku pro extrakci (kolem několika mg), krátká doba extrakce, možnost automatizace, stejně jako off-line a on-line vazba s většinou chromatografické techniky (GC, HPLC). Rozpouštědlo použité v SFE je tekutina v superkritickém stavu, obvykle se jedná o oxid uhličitý, a to vzhledem k jeho nízké ceně a nízké toxicitě (Arceusz et al. 2013).

Mnoho parametrů ovlivňuje účinnost extrakce superkritickými tekutinami. Lze je rozdělit do dvou skupin. První zahrnuje parametry související s prováděním extrakce, jako je tlak, teplota, čas, hmotnost vzorku a intenzita toku. Druhá skupina zahrnuje parametry spojené s matricí vzorku, jako je její forma, homogenita, rozpustnost a desorpční schopnost analytů. Kromě toho závisí proces SFE na pH. Jeho variace mohou ovlivnit výtěžnost extrakce a rychlost extrakce analytu z vodné fáze (Kazazi et al. 2009).

SFE se běžně používá ve farmaceutickém průmyslu i v potravinářských a kosmetických oborech. Extrakce superkritickou tekutinou slouží k izolaci biologicky aktivních sloučenin z rostlinných materiálů, zejména těch, které nelze oddělit pomocí jednoduché extrakce rozpouštědlem.

3.4.2 Metody stanovení amygdalinu metodou HPLC

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z účinných metod pro separaci komplexních směsí látek, široce používaných jak v analytické chemii, tak v chemické technologii. Analytická metoda HPLC je součástí skupiny metod, které vzhledem ke složitosti studovaných objektů zahrnují předběžné rozdělení počáteční komplexní směsi na relativně jednoduché. Výsledné jednoduché směsi se poté analyzují konvenčními fyzikálně-chemickými metodami nebo speciálními metodami vytvořenými pro chromatografii. Princip kapalinové chromatografie je oddělení složek směsi na základě rozdílu v jejich rovnovážném rozdělení mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž jedna je stacionární a druhá mobilní (eluent). HPLC s obrácenými fázemi (RP-HPLC) je jednou z nejrozšířenějších metod díky své rychlosti, stabilitě kolony a schopnosti oddělit širokou škálu sloučenin. V procesu existují dvě varianty HPLC, v závislosti na stacionárním fázovém systému. Tato metoda odděluje analyty na základě polarity. NP-HPLC používá polární stacionární fázi a nepolární mobilní fázi. Stacionární fázi je proto obvykle oxid křemičitý a typické mobilní fáze jsou hexan, methylenchlorid, chloroform, diethylether a jejich směsi. Polární látky jsou tedy zadrženy na polárním povrchu kolony a jejich retenční časy jsou delší než pro méně polární sloučeniny. V případě HPLC s reverzní fází je stacionární fáze nepolární (hydrofobní) povahy, zatímco mobilní fáze je polární kapalina, například voda, methanol, acetonitril nebo jejich směsi. HPLC s reverzní fází pracuje na principu hydrofobních interakcí, takže čím je látka více nepolární, tím déle bude na koloně zadržena. HPLC s obrácenými fázemi je zdaleka nejoblíbenější režimem v chromatografii. Téměř 90 % všech analýz vzorků s nízkou molekulovou hmotností se provádí pomocí RP-HPLC (Ravi Sankar et al. 2019).

Podle separačního mechanismu analyzovaných látek se HPLC dělí na adsorpční, distribuční, iontově výměnou, vyloučovací a výměnou chromatografii. Je třeba mít na paměti, že v praxi separace často neprobíhá jedním, ale několika mechanismy současně. Vyloučovací je tedy komplikováno adsorpčními účinky, adsorpce distribucí a naopak. Kromě toho, čím větší je rozdíl v látkách ve vzorku podle stupně ionizace, zásaditosti nebo kyselosti, molekulové hmotnosti, polarizovatelnosti a dalších parametrů, tím větší je pravděpodobnost odlišného separačního mechanismu pro takové látky.

System HPLC se skládá z několika jednotek a to čerpadla, dávkovače, kolony, detektoru a záznamového zařízení. Nejběžnějším detektorem v adsorpční HPLC je spektrofotometr. Během eluce látek v mikrokvetě se měří absorbance při předem zvolené vlnové délce odpovídající maximální absorpci látek, které se stanovují. Takové detektory měří absorpci světla v ultrafialové nebo viditelné oblasti spektra (Borisova 2014).

Mnoho vědců použilo HPLC metodu pro stanovení množství amygdalinu v různých rostlinných materiálech. Metoda HPLC byla validována podle linearitu, reprodukovatelnosti, limitu detekce a přesnosti. Linearita byla ověřena pomocí standardních roztoků D-amygdalinu. Identifikace sloučeniny byla založena na přesné hmotnosti, charakteristických fragmentačních drahách a retenčních časech (Shuya Xu et al. 2017). K provedení analýzy musí být vzorek správně extrahován z rostlinného materiálu.

4 Metodika

4.1 Použité chemikálie

- Ethanol – čistota 96 % (Lachner, Česká republika)
- Diethylether p.a. stabilizovaný (Lachner, Česká republika)
- Methanol p.a. (Lachner, Česká republika)
- Deionizovaná voda (Millipore, Francie)
- Redestilovaná voda (GFL, Německo)
- Standard: Amygdalin – čistota $\geq 97\%$, BioXtra (Sigma Aldrich)

4.2 Pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Automatické pipety (100 – 1000 μ l) (Thermo Scientific, Česká republika)
- Injekční jednorázové stříkačky Luer-Slip (3 ml) (Fischer Scientific, Německo)
- Jednorázové plastové kyvety 45 ml, Plastibrand (GmbH, Německo)
- Pipety (Socorex Acura, Švýcarsko)
- Filtrační papír (VWR, Německo)
- Membránový filtr Nylon (13 mm, 0,2 μ m) (Agilent Technologies, Čína)
- PVDF mikrofiltry s porozitou 0,45 μ m (Chromservis, Česká republika)
- HPLC vialky (2 ml) (VT0098M-1232, Německo)

4.3 Přístroje

- Porcelánová miska třecí, 30 ml
- Mlýnek IKA A 11 basic Analytical mill (Janke & Kunkel Co., Staufen, Německo)
- Chromatografický systém HPLC, Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Rotační vakuová odparka BÜCHI Rotavapor (BÜCHI Laboraltechnik AG, Švýcarsko)
- Vodní lázeň (GFL, Německo)
- Přístroj na přípravu redestilované vody GFL 2104 (GFL, Německo)
- Centrifuga 5810R (Eppendorf, Německo)
- Filtrační přístroj pro demineralizaci vody značky Millipore, s vodní vývěvou (Francie)
- Lednice (R6139W, Gorenje, Slovinsko)
- Analytické váhy (Kern&Sohn GmbH, Německo)
- Váhy s přesností na 3 a 4 desetinná místa (Kern&Sohn GmbH, Německo)
- Třepačka VORTEX SA 7 (Stuart, Anglie)
- RVO IKA (HPST, s.r.o., Česká republika)

4.4 Experimentální materiál

Byla provedena analýza semen 4 druhů jablek a jednoho směsný pokusného vzorku, pro něj byla použita semena jablek různých druhů zakoupených v obchodech. Všechny vzorky byly analyzovány ve dvou paralelních stanoveních.

Pro analýzu byly vybrány následující odrůdy jablek:

- Topaz (*Malus domestica Topaz*)
- Orion (*Malus domestica Orion*)
- Luna (*Malus domestica Luna*)
- Golden delicious (*Malus domestica Golden Delicious*).

Ze stejného počtu kusů jablek byl získán jiný počet semen. K získání požadované hmotnosti semen nejvíce semen bylo potřeba jablek odrůdy Orion a Luna. Všechny jabloně rostou v jednom produkčním sadu na experimentálním pozemku ČZU v Praze Suchdole. Analýza půdy poskytla následující informace o kvalitě půdy:

- pH CaCl₂ 7, 6
- P 230 mg.kg⁻¹
- K 432 mg.kg⁻¹
- Ca 8476 mg.kg⁻¹
- Mg 215 mg.kg⁻¹
- S 24, 3 mg.kg⁻¹; Cu 7, 65 mg.kg⁻¹; Fe 77, 1 mg.kg⁻¹; Zn 14, 7 mg.kg⁻¹; Mn 210 mg.kg⁻¹; Al 374 mg.kg⁻¹.

4.4.1 Příprava vzorku

Semena byla rozdrčena v mlýnku a třecí misce. 5 g vzorku bylo rozmléto a 2 g byly navážený do 500ml varně baňky, bylo přidáno 50 ml ethanolu a směs byla extrahována ve vodní lázni pod zpětným chladičem 100 minut při teplotě bodu varu ethanolu 78,6 °C za občasné míchání.

Neextrahuje se Soxhletem, pouze pod dostatečně dlouhým zpětným chladičem. Delší doba extrakce než 100 minut snižuje účinnost, neboť dochází ke konverzi amygdalinu na neoamygdalin (Senica et al. 2019).

Po vychladnutí je obsah baňky přefiltrován přes Whatmanův filtr č.1 a ethanol do sucha odpařen na rotačné vakuové odparce (35 °C, 7 mbar, nízká frekvence otaček). K suchému vzorku bylo přidáno 10 ml diethyletheru a směs byla vortexována 1 minutu při pokojové teplotě, poté došlo k vysrážení amygdalinu. Vzorek byl ponechán v digestoři k odpaření diethyletheru přes noc. Sraženina amygdalinu byla rozpouštěna v 5 ml deionizované vody. Alikvotní část byla převedena do eppendorfek a odstředěna (10 minut při pokojové teplotě a přihlížení 16000 x g). Supernatent byl přefiltrován přes membránový mikrofiltr PTFE, 0,45 μm.

4.4.2 HPLC stanovení

HPLC stanovení bylo prováděné na přístroji WATERS. Separace byla dosažena na koloně C18 (150 x 4,6 mm, 3 µm). Mobilní fáze se skládala z methanolu a vody v poměru 25 : 75. Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml.min⁻¹. Nástřik extraktu činil 10 µl. Protože maximální absorpce amygdalinu je 215 nm, detekční vlnová délka na detektoru PDA byla nastavena na 215 nm. Teplota kolony byla 30 °C.

Kalibrační závislost byla připraveny v rozsahu 1 – 100 µg.ml⁻¹, závislost je lineární minimálně do 400 µg.ml⁻¹.

5 Výsledky

Obsah amygdalinu v analyzovaných semenech jablek je uveden v tabulce 1.

Tab. 1. Obsah amygdalinu v semenech jablek vypěstovaných v Praze Suchdole

Vzorek	navážka [g]	Obsah amygdalinu [mg.g ⁻¹]	Průměr [mg.g ⁻¹]	směr. odchyl. [mg.g ⁻¹]
Směsný vzorek – 1	2,003	5,54	5,66	0,11
Směsný vzorek – 2	1,768	5,77		
Topaz – 1	2,003	8,46	7,55	0,91
Topaz – 2	2,099	6,64		
Orion – 1	2,003	5,87	5,74	0,18
Orion – 2	2,001	5,61		
Luna – 1	2,002	5,93	7,67	1,74
Luna – 2	2,002	9,41		
Golden delicious – 1	2,004	6,80	4,94	1,85
Golden delicious – 2	2,004	3,09		

Výsledky obsahu amygdalinu v semenech jablek vypěstovaných v Praze Suchdole jsou v souladu se stávajícími studii zabyvajícími se sledováním amygdalinu v jablečných semenech. Semena Luna měla nejvyšší obsah amygdalinu (7,67 mg.g⁻¹), nejnižší obsah ukazovala odrůda Golden Delicious (4,94 mg.g⁻¹).

6 Diskuze

Haque (2002) stanovil obsah amygdalinu v jablkách odrůdy Fuji apple v množství 5,4 mg.g⁻¹. Bolarinwa et al. (2015) uvádí následující údaje o množství amygdalinu v semenech jablek 15 druhů. Semena Golden Delicious měla nejvyšší obsah amygdalinu (3,9 mg.g⁻¹) následovala semena odrůd Royal Gala (3 mg.g⁻¹), Red Delicious (2,8 mg.g⁻¹), Spartan (2,6 mg.g⁻¹) a Pink Lady (2,6 mg.g⁻¹). Obsah amygdalinu v semenech jablek Rubens, Elstar, Empire a Jazz byl 2,4; 2,4; 2,3 respektive 2,2 mg.g⁻¹. Nižší obsah amygdalinu byl stanoven v odrůdách Fuji (1,9 mg.g⁻¹), Coxu (1,6 mg.g⁻¹), Granny Smith (1,6 mg.g⁻¹), Bramley (1,3 mg.g⁻¹) a Braeburn (1,2 mg.g⁻¹). Nejnižší obsah amygdalinu ukazovala odrůda Russet 1 mg.g⁻¹. Obsah amygdalinu v jablečných semenech by mohl generovat mezi 0,06 a 0,2 mg kyanidu na gram jablečných semen. Tyto hodnoty jsou relativně vysoké.

V nedávné studii zabývají se stanovením amygdalinu v jablečných semenech rodu Golden Delicious (Mikulic-Petkovsek et al. 2019) byly získány nižší hodnoty obsahu amygdalinu. V tomto článku byla analyzována jablka stejného druhu, ale pěstovaná v různých podmínkách v různých zemích. Množství amygdalinu v semenech jablek z Ázerbajdžánu bylo 1,1 mg.g⁻¹, v semenech jablek z Ruska 0,68 mg.g⁻¹, v semenech jablek ze Srbska 0,75 mg.g⁻¹, v semenech jablek ze Slovinska 0,73 mg.g⁻¹.

Mikulic-Petkovsek et al. (2019) popisují, že rostliny syntetizují kyanogenní glykosidy a ukládají je do semen za negativních okolních podmínek. V dříve publikované studii je uváděno, že obsah kyanogenních glykosidů byl vyšší v suchých rostlinách než v dobře zavlažovaných rostlinách. Podle situační a výhledové zpravy Ministerstva zemědělství ČR za 2019 rok, byl již od února 2018 na většině území ČR pozorován srážkový deficit a sezónu navíc negativně začalo ovlivňovat rozsáhlé sucho a mimořádně vysoké a dlouhotrvající teploty doprovázené slunečním zářením (Buchtová 2019). Z těchto důvodů lze předpokládat, že relativně vysoký obsah amygdalinu v odrůdách Topaz a Luna může být kromě jiného vyvolán těmito faktory, avšak vzhledem k tomu, že se studie nezabývala celou řadou dalších faktorů ovlivňujících množství amygdalinu v rostlinách, nelze to s jistotou tvrdit. Také nelze spolehlivě vysvětlit, proč dvě paralelní stanovení odrůd Orion a Golden delicious nevykazují stejně vysoké hodnoty obsahu amygdalinu. Je možné předpokládat, že jablka, ze kterých byla semena získána pro studii, nebyla ve stejném stadiu zralosti, což by jistě mohlo ovlivnit výsledky studie. Je také pravděpodobné, že metabolické procesy v jablkách různých odrůd probíhají s menšími odchylkami. To vyplývá z odlišností chuťových a sensorických vlastností jednotlivých odrůd a také to znamená, že tvorba stejných látek, které obsahuje rostlinná hmota jablek, jako jsou cukry a kyseliny, probíhá rozdílně. Totéž lze říci o kyanogenních glykosidech.

Mikulic-Petkovsek et al. (2019) dále tvrdí, že také půda může být dalším důvodem vyššího obsahu kyanogenních glykosidů v jablečných semenech z Ázerbajdžánu. Město Xudat, odkud prochází jablka, leží v blízkosti Kaspického moře a sadová půda měla vyšší obsah soli. Bylo prokázáno, že obsah kyanogenních glykosidů roste v rostlinách s vysokou slaností půdy, v listech se syntetizují kyanogenní glykosidy a poté se transportují do jiných částí rostlin. Zhao (2012) také uvedl, že během vývoje ovoce se některé kyanogenní glykosidy syntetizují v buněčném tegumentu a následně se transportují do semenného kotyledonu. Půda sadu, kde byly pěstována jablka, odebraná pro výzkum, má pH 7,5, což

umožňuje považovat půdu za mírně zásaditou. Alkalické půdy mají zpravidla vysoký obsah vápenatých solí, tento faktor může také ovlivnit množství amygdalinu v semenech jablek. Bylo by tedy zajímavé sledovat, jak složení půdy ovlivňuje tvorbu kyanogenních glykosidů v rostlinách.

Společně s fenolnými látkami hrají kyanogenní glykosidy také důležitou roli jako účinná ochrana před býložravci a mohou představovat významný odliv zdrojů, které by jinak mohly být použity pro růst (Mikulic-Petkovsek et al. 2019). Údaje o počtu škůdců v sadu nejsou dostupné. Podle dostupných údajů však lze tvrdit, že v sadu, kde byla jablka odebrána pro výzkum, byla včas přijata nezbytná opatření na ochranu před škůdci, jako jsou instalace zvláštního oplocení na kmeny stromů pro ochranu kůry od hlodavci, sběr infikovaných a poškozených jablek z větví a ze země pod jabloněmi. Odstranění poškozeného ovoce se provádí každý týden v sezóně.

Teplota, kyslík a oxid uhličitý jsou důležité pro intenzitu dýchání během skladování. Čím vyšší je rychlost dýchání, tím vyšší je koncentrace CO₂. Skupinou vědců byla studována semena jablek, která byla skladována v typických podmínkách skladů ovoce po dobu 100 po sklizni, 180 a 240 dní. Mikulic-Petkovsek et al. (2019) uvádí, že po 180 dnech skladování v řízené atmosféře se obsah kyanogenních glykosidů v jablečných semenech snížil. Ale během období aktivního dýchání, tj. po sklizni ovoce a jeho skladování po dobu šesti měsíců, bylo možné pozorovat nárůst počtu kyanogenních glykosidů v semenech jablek. Pro studii byla použita také padlá jablka s neznámou dobou přetrvávání na půdě. Pro další výzkum je nutně použít jablka sklizená za známých a stejných podmínek. Lze předpokládat, že tyto neznámé faktory by mohly ovlivnit výsledky studie, například způsobit velký rozdíl mezi dvěma vzorky semen stejné odrůdy.

Pokud jde o směsný pokusný vzorek, jak již bylo napsáno výše, byla pro něj použita semena různých odrůd jablek odebraných krátce před laboratorní prací. Tato semena byla získána z jablek s neznámou dobou skladování v podmínkách skladu a obchodu, kde byla zakoupena. Zatímco byla semena čtyř odrůd jablek odebrána z čerstvého rostlinného materiálu a poté uložena 2 měsíce v suchu před laboratorní studií, byla semena směsného pokusného vzorku odebrána týden před clastní analýzou. Rozdíl v obsahu amygdalinu mezi dvěma směsnými pokusnými vzorky je menší ve srovnání s rozdílem obsahu amygdalinu ve známých odrůdách. V plánované diplomové práci bude minimalizován čas mezi sběrem rostlinného materiálu a prováděním laboratorní analýzy.

Kyanogenní glykosidy jsou přírodní toxiny rostlin. Působení endogenních rostlinných enzymů může uvolňovat kyanovodík, což může způsobit potenciální problémy s toxicitou pro živočichy, včetně lidí. V semenech jablek nevyvolává amygdalin jedovatý účinek, pokud jsou jablka konzumována v přiměřeném množství.

Amygdalin patří mezi glykosidy, které se nejčastěji vyskytují mezi sekundárními rostlinnými metabolity. Amygdalin má obecné vlastnosti glykosidů i vlastnosti specifické, co vše se odráží v procesu izolace látky z rostlinné hmoty a její analýze.

Co se týče protirakovinových vlastností amygdalinu, pak v tuto chvíli není možné dát jednoznačnou odpověď zda má amygdalin tyto vlastnosti nebo nemá. Analýza dostupné odborné literatury vede k poznatku, že existují přinejmenším 2 teorie, které si vzájemně odporují, a každá má svou vlastní důkazní základnu.

7 Závěr

Kyanogenní glykosidy včetně amygdalinu jsou z lékařského a kosmetického hlediska rozsáhlou a velmi důležitou skupinou přírodních glykosidů.

Aglykon amygdalinu je reprezentován jednou molekulou benzaldehydu, který má analgetický účinek a jednou molekulou kyseliny kyanovodíkové, která je toxická.

Rostliny obsahující kyanogenní glykosidy jsou v přírodě zcela běžné. Nacházejí se ve flóře téměř ve všech částech světa. Známo je kolem 75 kyanogenních glykosidů. Jsou to kyanogeny mnoha rostlin konzumovaných jako složky lidské potravy nebo používaných jako krmiva hospodářských zvířat. Jsou obsaženy ve dvouděložných rostlinách čeledi bobovitých (*Fabaceae*), pryšcovitých (*Euphorbiaceae*) a mučenkovitých (*Passifloraceae*) a v jednoděložných rostlinách čeledi lipnicovitých (*Poaceae*) a áronovitých (*Araceae*).

V ČR je amygdalin nejvýznamnějším kyanogenním glykosidem. Amygdalin se nachází v rostlinách čeledi růžovitých (*Rosaceae*). Významnými zdroji jsou hořké mandle a pecky merunek, broskví, švestek a třešní. V peckách broskve je 2,4 mg.100 g⁻¹ amygdalinu. Amygdalin byl nalezen též v jádrech švestky (4100 mg.100 g⁻¹), meruňky (2394 mg.100 g⁻¹) a třešní (2306 mg.100 g⁻¹). V sušině jader hořkých mandlí byly stanovené hladiny amygdalinu 5808 mg.100 g⁻¹ a v sušině jader sladkých mandlí 106 mg.100 g⁻¹, ale jsou známy také sladké odrůdy mandlí, v nichž amygdalin nebyl detekován.

V malém množství je také obsažen v jádrech jablek, hrušek a kdoulí. Obsah amygdalinu v jablečných semenech se podle literárních údajů pohybuje od 1 do 4 mg.g⁻¹. V semenech jablek 4 odrůd vypěstovaných v Praze Suchdole bylo zjištěno 5,54-9,41 mg.g⁻¹ amygdalinu. Semena Luna měla nejvyšší obsah amygdalinu (7,67 mg.g⁻¹), nejnižší obsah vykazovala odrůda Golden Delicious (4,94 mg.g⁻¹).

Neexistuje žádné nebezpečí, že by spotřebitelé po konzumaci přiměřeného počtu semen jablek pocítovali toxické účinky kyanogenních glykosidů.

K bioaktivaci amygdalinu dochází pomocí enzymů. V případě, že tkáň rostliny obsahující amygdalin je poškozena například napadením býložravci, je amygdalin bioaktivován β-glukosidázami. Dochází k uvolnění kyanovodíku, čímž dochází k okamžité chemické obraně proti býložravcům. Kyanid je toxický pro všechny živé buňky.

Pokud jde o možné protirakovinné vlastnosti amygdalinu, na základě analýzy současných studií věnujících se tomuto tématu, nelze dat jednoznačnou odpověď, zda amygdalin skutečně těmito vlastnostmi disponuje.

8 Literatura

- Abboud MM, Al Awaida W, Alkhateeb HH, Abu-ayyad AN. 2018. Antitumor action of amygdalin on human breast cancer cells by selective sensitization to oxidative stress. *Nutrition and Cancer* **71**: 1-8.
- Abe I. 2007. Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. *Natural Product Reports* **24**: 1311-1331).
- Alfarouk KO, Muddathir AK, Shayoub ME. 2011. Tumor acidity as evolutionary spite. *Cancers (Basel)* **3**: 408-414.
- Arceusz A, Wesolowski M, Konieczynski P. 2013. Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review. *Natural Product Communications* **8**. DOI: doi.org/10.1177/1934578X1300801238.
- Augustin JM, Kuzina V, Andersen SB, Bak S. 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* **72**: 435-457.
- Bandman AL, Ivin BA, Filov VA. 1988. Škodlivé chemikálie, anorganické sloučeniny prvků I – IV skupiny. Chemie, Moskva.
- Bauer K. 1953. Analýza organických sloučenin. Nakladatelství zahraniční literatury, Petrohrad.
- Biaglow JE., Durand RE. 1978. The enhanced radiation response of an in Vitro tumour model by cyanide released from hydrolysed amygdalin. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* **33**: 397-401.
- Bolarinwa IF, Oke MO, Olaniyan SA, Ajala AS. 2016. A review of cyanogenic glycosides in edible plants. DOI: 10.5772/64886 .
- Bolarinwa IF, Orfila C, Morgan MRA. 2015. Determination of amygdalin in apple seeds, fresh apples and processed apple juices. *Food Chemistry* **170**: 437 – 442.
- Borisova GG. 2014. Základy biochemie sekundárního metabolismu rostlin. Nakladatelství Uralské státní univerzity, Jekatěrinburg.
- Bromley J, Hughes B, Leong D, Buckley N. 2005. Life threatening interaction between complementary medicines: cyanide toxicity following ingestion of amygdalin and vitamin C. *Annals of Pharmacotherapy* **39**: 1566-1569.
- Buchancová J. 2003. Pracovní lékařstvo a toxikologia. Osveta, Martin.
- Buchtová I. 2018. Odbor rostlinných komodit. Mze, Praha.

- Corradi C, Micheli G. 1982. Total hydrocyanic acid content of macaroons. *Industry Alimentary* **21**: 459-466.
- Danihelka J, Šmarda P. 2001. *Triglochin maritima* na slanisku u Nesytu. *Zprávy České botanické společnosti* **36**: 45-47.
- Del Cuetoa J, Møllerb BL, Dicentaa F, Sánchez-Pérez R. 2018. β -Glucosidase activity in almond seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* **126**: 163–172.
- Dong-Sil P, Coats JR. 2002. Cyanogenic glycosides: alternative insecticides? *The Korean journal of pesticide science* **6**: 51-57.
- Fadeeva N. 2000. Technologie extrakce biomasy *Padus avium mill* [PhD. Thesis]. Sibiřská státní technologická univerzita, Krasnojarsk.
- Ferreira VLP, Yotsuyanagi K, Carvalho CRL. 1995. Elimination of cyanogenic compounds from bamboo shoots *Dendrocalamus giganteus Munro*. *Tropical Science* **35**: 342-346.
- Franks TK, Yadollahi A, Wirthensohn MG, Guerin J, Kaiser BN, Sedgley M, Ford CM. 2008. A seed coat cyanohydrin glucosyltransferase is associated with bitterness in almond (*Prunus dulcis*) kernels. *Plant Physiology and Biochemistry* **35**: 236–246.
- Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules* **15**: 8813-8826.
- Gusynin IA. 1962. Toxikologie jedovatých rostlin. Nakladatelství zemědělské literatury, časopisů a plakátů, Moskva. Available from <http://www.cnsnb.ru/AKDiL/0045/base/k031.shtm> (accessed November 2018).
- Haque MR, Bradbury JH. 2002. Total cyanide determination of plants and foods using the picrate and acid hydrolysis methods. *Food Chemistry* **77**: 107-114.
- Chen YU, Ma J, Wang F. 2013. Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **35**: 43-51.
- James A. 2002. *CRC Handbook of Medicinal Spices*. CRC Press, Boca Raton.
- Kagan IA. 2011. Effects of pH, sample size, and solvent partitioning on recovery of soluble phenolic acids and isoflavonoids in leaves and stems of red clover (*Trifolium pratense* cv. *Kenland*). *Natural Product Communications* **6**: 1657-1660.
- Karpuk VV. 2011. *Farmakognosy*. Běloruská státní univerzita, Minsk.

- Kazazi H, Rezaei K. 2009. Effect of various parameters on the selective extraction of main components from Hyssop using supercritical fluid extraction (SFE). *Food Science and Technology Research* **15**: 645-652.
- Khaletsky AM. 1966. *Farmaceutická chemie. Medicína*, Moskva.
- Kramarenko VF. 2012. *Toxikologická chemie. Kniha na vyžádání*, Moskva.
- Kysilka J. 2001. *Přírodní látky. Chlumeč nad Cidlinou*. Available from https://cs.wikibooks.org/wiki/Chemie_přírodních_látek/Přehled_přírodních_látek/Glykosidy (accessed November 2019).
- Larramendy M, Soloneski S, editors. *Toxicology – new aspects to this scientific conundrum*. InTechOpen, London. Available from <https://www.intechopen.com/books/toxicology-new-aspects-to-this-scientific-conundrum> (accessed January 2020).
- Lea MA, Koch MR. 1979. Effects of cyanate, thiocyanate, and amygdalin on metabolite uptake in normal and neoplastic tissues of the rat. *Journal of the National Cancer Institute* **63**: 1279-1283.
- Lee SH, Oh A, Shin SH, Kim HN, Kang WW, Chung SK. 2017. Amygdalin contents in peaches at different fruit development stages. *Preventive nutrition and food science* **22**: 237–240.
- Lehmann P. 1977. Laetrile: the fatal cure. *FDA Consumer* **11**: 10-15.
- Liflanský VG. 2006. *Obecná charakteristika vitamínů a minerálů. Od A do Z*. Neva, Petrohrad.
- Lucas B, Sotelo A. 1983. A simplified test for the quantitation of cyanogenic glucoside in wild and cultivated seeds. *Nutrition reports international* **29**: 711-719.
- Makarević J, Rutz J, Juengel E. 2014. Amygdalin blocks bladder cancer cell growth in vitro by diminishing cyclin A and cdk2. *PLoS One* **9**(8):e105590. DOI: 10.1371/journal.pone.0105590.
- Manyakhin AY, Koldaev VM. 2019. Amygdalin v plodech rostlin z čeledi *Rosaceae* rostoucích v Primorje. *Pacific Medical Journal* **2**: 62-64.
- Megarbane B, Delahaye A, Goldgran-Toledano D, Baud FJ. 2003. Antidotal treatment of cyanide poisoning. *Journal of the Chinese medical association*. **66**: 193-203.
- Milazzo S, Horneber M. 2015. Laetrile treatment for cancer. *Cochrane Database of systematic reviews* 4:CD005476. DOI: 10.1002/14651858.CD005476.pub4.

- Milazzo S, Lejeune S, Ernst E. 2007. Laetrile for cancer: a systematic review of the clinical evidence. *Supportive Care Cancer* **15**: 583-595.
- Moertel CG, Fleming TR, Rubin J. 1982. A clinical trial of amygdalin (Laetrile) in the treatment of human cancer. *New England Journal of Medicine* **306**: 201-206.
- Moon JY, Kim SW, Yun GM. 2015. Inhibition of cell growth and down-regulation of telomerase activity by amygdalin in human cancer cell lines. *Animal Cells and Systems* **19**: 295-304.
- National center for biotechnology information. 2004. PubChem Database. Hydrogen cyanide, CID=768. Available from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrogen-cyanide> (accessed February 2020).
- Neznamova EG. 2007. Environmentální toxikologie. Tomská státní univerzita řídicích systémů a radioelektroniky, Tomsk.
- Oweis S, Wu L, Kiela PR, Zhao H, Malhotra D, Ghishan FK, Xie Z, Shapiro JI, Liu J. 2006. Cardiac glycoside downregulates NHE3 activity and expression in LLC-PK1 cells. *American journal of physiology* **290**: 997-1008.
- Pavlíková M. 2009. Izolace a analýza arbutin [MSc. Thesis]. Technická univerzita, Liberec.
- Petrovsky BV. 1988. Velká lékařská encyklopedie. Sovětská encyklopedie, Moskva.
- Piotrowski M, Schönfelder S, Weiler EW. 2001. The Arabidopsis thaliana isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode beta-cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. *The journal of biological chemistry* **276**: 2616-2621.
- Plemenkov VV. 2001. Úvod do chemie přírodních látek. Kazanská federální univerzita, Kazan.
- Rajaei A, Barzegar M, Hamidi Z, Sahari MA. 2010. Optimization of extraction conditions of phenolic compounds from pistachio (*Pistachia vera*) green hull through response surface method. *Journal of agricultural science and technology* **12**: 605-615.
- Raquel S, Jørgensen K, Olsen CE, Dicenta F, Møller BL. 2008. Bitterness in Almonds. *American Society of Plant Biologists* **146**: 1040-1052.
- Ravi SP, Sai Snehalatha K, Shaik. Tabassum F, Srinivasa BP. 2019. Applications of HPLC in pharmaceutical analysis. *International journal of pharmaceutical sciences review and research* **59**: 117-124.

- Roze LV, Chanda A, Linz JE. 2011. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 35-48.
- Salama RH, Ramadan AER, Alsanory TA, Herdan MO, Fathallah OM, Alsanory AA. 2019. Experimental and therapeutic trials of amygdalin. *International Journal of Biochemistry and Pharmacology* **1**: 21-26.
- Senica M, Stampar F, Veberic R, Mikulic-Petkovsek M. 2019. Cyanogenic glycosides and phenolics in apple seeds and their changes during long term storage. *Scientia Horticulturae* **255**: 30-36.
- Shahidi F, Wanasundara PK. 1997. Cyanogenic glycosides of flaxseeds. Pages 171-185 in Shahidi F., editor. *Antinutrients and phytochemicals in food*. ACS Symposium Serie 622.
- Shi J, Chen Q, Xu M, Xia Q, Zheng T, Teng J, Li M, Fan L. 2019. Recent updates and future perspectives about amygdalin as a potential anticancer agent: A review. *Cancer Medicine* **8**: 3004-3011.
- Státní zemědělská a potravinářská inspekce. 2009. Mandle, jak je neznáme. Available from <http://www.szpi.gov.cz/clanek/mandle-jak-je-nezname.aspx> (accessed December 2020).
- Todorova A, Pesheva M, Iliev I, Bardarov K, Todorova T. 2017. Antimutagenic, antirecombinogenic, and antitumor effect of amygdalin in a yeast cell-based test and mammalian cell lines. *Journal of Medicinal Food* **20**: 360-366.
- Usai M, D'hallewin G. 1992. Cyanogenic glucosides contained in different organs of bitter and sweet almond. Pages 233-236 in EUR 14081 Amélioration génétique de deux espèces de fruits secs méditerranéens: L'amandier et le pistachier. Proceedings of the VIII Grempa Meeting. Nîmes, France.
- Vagazova GI. 2010. Léčivé rostliny – zdroj biologicky aktivních látek. Vědecké poznámky Kazaňské státní akademie veterinárního lékařství pojmenované po NE Baumanovi **203**: 44-48.
- Velíšek J, Hajšlová J. 2009. *Chemie potravin II*. Osis, Tábor.
- Xing G, Yang JY. 2003. Advances in natural amygdalin. *Traditional Chinese patent medicine* **25**: 1007-1009.
- Xu S, Xu X, Yuan S, Liu H, Liu M, Zhang Y, Zhang H, Gao Y, Lin R, Li X. 2017. Identification and Analysis of Amygdalin, Neoamygdalin and Amygdalin Amide in Different Processed Bitter Almonds by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-DAD. *Molecules* **22**. DOI: 10.3390/molecules22091425.

- Yildiz K, Dokuzeylul B, Gonul R., Erman M. 2017. Cyanide poisoning in cattle. *Jornal of dairy and veterinary sciences* (e555567) DOI: 10.19080/JDVS.2017.01.555567.
- Yinrong Lu, Yeap Foo L. 1998. Constitution of some chemical components of apple seed. *Food Chemistry* **61**: 29-33.
- Zhao Y. 2012. Amygdalin content in four stone fruit species at different developmental stages. *Science Asia* **38**: 218-222.

9 Seznam obrázků

Obrázek 1. Fenolové glykosidy. Jednoduché fenolické glykosidy. Available from <https://studfile.net/preview/5810922/page:3/> (accessed April 2020).

Obrázek 2. Flavony. Flavonoidy. Available from <https://ru.wikipedia.org/wiki/флавоноиды> (accessed April 2020).

Obrázek 3. Antokyany. Antokyany. Available from <https://ru.wikipedia.org/wiki/Антоцианы> (accessed April 2020).

Obrázek 4. Antrachinonový glykosid. Barbaloin. Available from <https://cs.wikipedia.org/wiki/Barbaloin> (accessed April 2020).

Obrázek 5. Glukosinoláty (Glukosinoláty. Available from <https://cs.wikipedia.org/wiki/Glukosinoláty> (accessed April 2020).

Obrázek 6. Kardioglykosidy. Cardiac glycoside. Available from https://en.wikipedia.org/wiki/Cardiac_glycoside (accessed April 2020).

Obrázek 7. Saponin. Saponiny. Available from <https://cs.wikipedia.org/wiki/Saponiny> (accessed April 2020).

Obrázek 8. Hořčiny. Hořčiny. Available from <https://cs.wikipedia.org/wiki/Horčiny> (accessed April 2020).

Obrázek 9. Amygdalin. Amygdalin. Available from <https://cs.wikipedia.org/wiki/Amygdalin> (accessed April 2020).

Obrázek 10. Byosyntéza amygdalinu. Sánchez-Pérez R, Del Cuetoa J, Møllerb ML, Dicenta F. 2018. β -Glucosidase activity in almond seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* **126**: 163-172.

Obrázek 11. Kyanogeneze.

Obrázek 12. Proces detoxikaci amygdalinu v rostlinných tkáních. Zea mays mays Pathway: cyanide detoxification I. 2012. Available from <https://corncyc-b73-v4.maizegdb.org/CORN/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=ASPSYNII-PWY> (accessed April 2020).

Obrázek 13. Laetril a amygdalin. Salama RH, Ramadan AR, Alsanorz TA, Herdan MO, Fathallah OM, Alsanory AA. 2019. Experimental and therapeutic trials of amygdalin. *International Journal of Biochemistry and Pharmacology* **1**: 21-26.