



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK
VE VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH ROSTLINNÝCH
EXTRAKTECH**

ANALYSIS OF SOME BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS IN NATURAL
PLANT EXTRACTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Ivana Kováčová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0990/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Ivana Kováčová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Stanovení biologicky aktivních látek ve vybraných přírodních rostlinných extraktech

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je:

- 1/ zpracování literární rešerše zaměřené na aktivní látky ve vybraných přírodních extraktech a jejich biologické účinky (sacharidy, fenolické látky, vitaminy, látky s antioxidačním příp. antimutagenním účinkem..)
- 2/ využití moderních metod analýzy a identifikace aktivních látek ve vybraných přírodních extraktech (kurkuma x ostropestřec mariánský)
- 3/ testování účinnosti aktivních látek z extraktů v modelových fyziologických podmínkách
- 4/ zpracování a vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Ivana Kováčová
Student(ka)

Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na studium účinnosti aktivních látek přírodních extraktů ostropestřce mariánského a kurkumovníku dlouhého. Popisuje využití moderních metod analýzy a identifikace aktivních látek v rostlinách ostropestřce a kurkumy. V experimentální části práce, které předcházela literární rešerše zaměřená na biologické účinky aktivních látek ve vybraných přírodních extraktech, byly extrakty charakterizovány pomocí skupinových charakteristik (stanovení celkových polyfenolů a celkových flavonoidů, stanovení antioxidační aktivity, stanovení obsahu vitamínu C a tokoferolu). Další část se zaměřuje na studium enkapsulace přírodních aktivních látek do organických částic tzv. liposomů. Jako aktivní látky byly enkapsulovány silymarin a kurkumin.

Představa rostliny s jedinou účinnou látkou je zpravidla mylná. Rostliny obvykle obsahují stovky složek, které na daném účinku spolupracují. Pro většinu bylinářů je proto účinnou složkou rostlina jako taková. U některých rostlin je však známá konkrétní účinná fytochemická látka. Příkladem je právě ostropestřec, kurkumin, či ginkgo. V těchto případech je účinná látka nepoměrně účinnější než samotná rostlina.

Enkapsulační účinnost aktivních látek silymarinu a kurkuminu byla stanovena pomocí HPLC/PDA. V rámci práce bylo sledováno chování částic během inkubace v prostředí modelových trávicích šťáv a také stabilita při uchování částic v modelových potravinách.

ABSTRACT

This thesis is focused on the study of the effectiveness of active ingredients from natural extracts such as milk thistle and turmeric. The thesis describes the use of modern methods of analysis and identification of active substances located in plants of milk thistle and turmeric. In the experimental part of thesis, which was preceded by a literature search focused on the biological effects of active substances in the chosen natural extracts, the extracts were characterized according to group characteristics (total assessment of polyphenols and flavonoids, assessment of antioxidant activity, and assessment of vitamin C volume and tocopherol). The next part is focused on the study of the encapsulation of natural active substances into the organic particles: liposomes. Silymarin and curcumin were encapsulated as active substances. The idea of a plant with a single active ingredient is usually erroneous. Plants usually contain hundreds of components which cooperate on a given effect. Therefore, the majority of herbalists believe that a simple plant is an active ingredient. However, some plants are known to be containing a particular active phytochemical. For instance, plants such as the milk thistle, turmeric, or a ginkgo are great examples of the plant containing a particular active phytochemical. In these cases, the active compound is disproportionately more effective than the plant itself. Encapsulation efficiency of active ingredients of Silymarin and curcumin was determined by HPLC/PDA. The aim of the analysis was to observe the behavior of elements during the incubation in surrounding of gastric juice model, and the stability while maintaining the particles in model food.

KLÍČOVÁ SLOVA

Antioxidační aktivita, silymarin, kurkumin

KEYWORDS

Antioxidant activity, silymarin, curcumin

KOVÁČOVÁ, I. Stanovení biologicky aktivních látek ve vybraných přírodních rostlinných extraktech. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 68 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Hároniková, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis diplomanta

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Ing. Andree Háronikové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při vypracovávání diplomové práce.

Moje poděkování patří především rodičům a rodině za jejich podporu během celého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Biologicky aktivní látky	9
2.1.1	Klasifikace antioxidantů	10
2.1.2	Přírodní antioxidanty	11
2.1.3	Charakteristika vybraných druhů látek	12
2.1.4	Vitaminy	17
2.2	Ostropestřec mariánský	20
2.2.1	Chemické složení ostropestřce	21
2.2.2	Biologické účinky silymarinu	22
2.3	Kurkuma	24
2.3.1	Chemické složení kurkumy	25
2.3.2	Biologické účinky kurkuminu	26
2.4	Trávení	28
2.4.1	Žaludeční šťávy	28
2.4.2	Pankreatické šťávy	29
2.4.3	Žlučové šťávy	29
2.5	Enkapsulace	30
2.5.1	Liposomy	30
2.6	Metody stanovení	32
2.6.1	Stanovení antioxidační aktivity	32
2.6.2	Stanovení celkového obsahu polyfenolů	35
2.6.3	Stanovení celkového obsahu flavonoidů	35
2.6.4	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC	35
3	CÍLE	37
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1	Použité chemikálie a přístroje	38
4.1.1	Použité chemikálie	38

4.1.2	Použité přístroje a pomůcky	39
4.2	Vzorky	40
4.3	Příprava vzorků	43
4.3.1	Úprava vzorků pro úvodní charakterizaci	43
4.3.2	Úprava vzorků pro stanovení kyseliny askorbové	43
4.3.3	Úprava vzorků pro stanovení tokoferolu	43
4.3.4	Úprava vzorků pro stanovení účinné látky	43
4.3.5	Úprava vzorků pro kyselou hydrolýzu účinné látky	43
4.3.6	Úprava vzorků pro enkapsulaci	44
4.4	Stanovení celkových polyfenolů	44
4.5	Stanovení celkových flavonoidů	44
4.6	Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS	45
4.7	Stanovení kyseliny askorbové pomocí HPLC	45
4.8	Stanovení tokoferolu pomocí HPLC	46
4.9	Stanovení účinné látky pomocí HPLC	46
4.10	Kyselá hydrolýza účinné látky	46
4.11	Příprava částic pomocí ultrazvuku	46
4.12	Stanovení enkapsulační účinnosti částic	47
4.13	Stanovení stability částic v trávicích šťávách	47
4.13.1	Příprava žaludeční šťávy	47
4.13.2	Příprava pankreatické šťávy	47
4.13.3	Příprava žlučové šťávy	48
4.14	Stanovení stability částic v modelových potravinách	48
4.15	Stanovení stability částic v modelových potravinách v trávicích šťávách	48
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	49
5.1	Stanovení celkových polyfenolů	49
5.2	Stanovení celkových flavonoidů	51
5.3	Stanovení antioxidační aktivity	53
5.4	Stanovení kyseliny askorbové pomocí HPLC	54

5.5	Stanovení tokoferolu pomocí HPLC	55
5.6	Stanovení účinné látky pomocí HPLC	56
5.7	Kyselá hydrolýza účinné látky	56
5.8	Stanovení enkapsulační účinnosti částic	57
5.9	Stanovení stability částic v trávicích šťávách	57
5.10	Stanovení stability částic v modelových potravinách	58
5.10.1	Stanovení stability částic v modelových potravinách při následném trávení.....	59
6	ZÁVĚR.....	61
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	63
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	68

1 ÚVOD

Antioxidanty jsou významné biologicky aktivní látky, které mají schopnost různými způsoby likvidovat volné radikály. Jsou přirozeně produkovány aerobními organismy jako ochrana buněk. Volné radikály jsou naopak látky, které jsou pro lidské tělo nežádoucí, jsou pro organismus toxické. Mohou způsobovat vážná civilizační onemocnění, jako jsou kardiovaskulární choroby, rakovina nebo diabetes mellitus, dále mohou způsobovat předčasné stárnutí organismu. Přítomnost antioxidantů v lidském organismu je tudíž velmi žádoucí. Určité množství si tělo dokáže vytvořit samo, avšak část je nutné přijímat s potravou. Zpracováním potravin se obsah antioxidantů značně snižuje, ať už tepelným zpracováním nebo samovolnou oxidací vzdušným kyslíkem. K té dochází překvapivě rychle po dezintegraci potravin. Proto je nutné tyto látky určitým způsobem chránit, aby jich bylo při vstupu do organismu co nejvíce a byly schopné odstraňovat volné radikály. Jednou z možností ochrany antioxidantů je enkapsulace. V důsledku toho nejsou ve styku se vzdušným kyslíkem a nedochází tak k jejich oxidaci a degradaci. V potravinářském průmyslu je hlavním cílem enkapsulace ochrana aktivních látek a vitaminů před nepříznivým vlivem okolního prostředí při skladování a zejména při průchodu trávicím traktem, čímž je umožněno jejich řízené uvolňování a tím i zvýšení jejich biologické dostupnosti. Rostoucí zájem při tvorbě nosičů k ochraně a řízenému uvolňování biologicky aktivních látek, jako jsou například mastné kyseliny, fytosteroly, flavonoidy, vitaminy apod., se rozvíjí nejen v oblasti potravin, ale i v kosmetickém průmyslu a v biomedicině. Hlavním cílem je zabránit fyzikální nebo chemické degradaci v průběhu skladování a doručit je na "vhodné místo" působení, zároveň by částice neměly nepříznivě ovlivnit vzhled, stabilitu nebo texturu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Biologicky aktivní látky

Biologicky aktivní látky jsou látky působící na životní funkce organismu. Mohou ovlivňovat biochemické pochody organismů, průnik látek buňkami nebo mohou mít vliv na koordinační funkce živých organismů. Jejich účinky a působení závisí na řadě faktorů. Výrazný vědecký zájem o přirozené složky potravin vede k objasňování projevů vzájemného působení.

Biologicky aktivní látky lze rozdělit do následujících skupin:

- probiotika
- látky na bázi sacharidů
- aminokyseliny, peptidy, bílkoviny
- ostatní látky vycházející z primárního metabolismu
- látky sekundárního metabolismu [1].

Významnou biologicky aktivní látkou jsou antioxidanty, v současné době se jim věnuje velká pozornost. Antioxidanty, jsou látky, které prodlužují účinnost potravin tak, že je chrání před působením oxidace a zamezují tím jejich znehodnocení. Projevem znehodnocení může být žluknutí přítomných tuků a dalších látek, které se snadno oxidují.

Oxidace lipidů vyvolá další chemické změny v potravinách, které mohou negativně ovlivnit jejich výživovou hodnotu, hygienicko-toxikologickou a senzorickou hodnotu. Nejběžnějším typem oxidace během zpracování a skladování potravin je autooxidace mastných kyselin [2]. Primární produkty autooxidace jsou hydroperoxy mastných kyselin. Hydroperoxy zejména dienových a trienových kyselin jsou velmi nestálé a odštěpují vodíkový radikál (za vzniku peroxylového radikálu) nebo hydroxylový radikál (za vzniku alkoxylového radikálu). Volné radikály jsou atomy, molekuly či ionty schopné samostatné existence s jedním nepárovým elektronem ve svém elektronovém obalu. Snaží se získat další elektron a doplnit si tak elektronový pár do stabilní konfigurace. Z toho vyplývá jejich velká reaktivita. Reagují nejen s ostatními volnými radikály ale i s intaktními molekulami a tím vytváří další volný radikál. Tento děj má tendenci pokračovat formou řetězové reakce. Na začátku reakce je iniciační rychlost malá, ale postupně se v systému hromadí hydroperoxy, které vyvolávají tvorbu dalších radikálů. S rostoucí koncentrací peroxidů se tedy zvyšuje i rychlost iniciační reakce. Pokud je k dispozici dostatek kyslíku, reakční rychlost prudce vzrůstá, až dosáhne maxima. Působení antioxidantů také závisí na tom, s jakými vznikajícími reaktivními formami látek přijde do styku, v jakém prostředí se bude odehrávat jeho činnost, ale i to, co je cílem poškození oxidací [3].

V živých biologických systémech jsou oxidační pochody nezbytné pro získávání energie, u rozkládajících se biologických materiálů se podílí na vzniku jednoduchých sloučenin, které se vracejí do koloběhu prvků v přírodě. Jako nežádoucí se jeví příliš rychlá oxidace, nebo oxidace příliš velkého rozsahu [5].

V přírodním prostředí i v technologických procesech dochází ke generování volných radikálů. Hlavními zdroji volných radikálů v živých organismech jsou za běžných podmínek procesy jako:

- běžné životní pochody, při nichž buňka získává energii nebo štěpí látky nutné pro buněčnou výživu
- některé chemické reakce, spontánně probíhající uvnitř buněk, či za přítomnosti cizorodých látek
- záření, nejčastěji UV záření. V procesu přirozeného stárnutí má hlavní vliv tvorba volných radikálů při buněčném dýchání.

Mnoho lidských chorob je způsobeno nebo negativně ovlivněno právě volnými radikály. Volné radikály poškozují biomolekuly, respektive jejich hlavní složky. Oxidaci podléhají i bílkoviny, dochází k poškození dusíkatýchází DNA s možností mutací a kancerogeneze. Přirozená obrana lidského organismu proti působení volných radikálů není vždy dostačující. Dostatečný přísun antioxidantů potravou tak hraje důležitou roli při ochraně organismu [4]

Volné radikály mohou způsobovat různá onemocnění, jako jsou onemocnění srdce a cév, neurodegenerativní choroby, poruchy imunity, revmatické záněty kloubů, kožní choroby, nádory a mnohé další. Volné radikály také podporují celkové stárnutí organismu. Rozsáhlé klinické a epidemiologické studie poukazují na spojení antioxidační aktivity látek přítomných v potravinách s prevencí různých výše vzpomínaných nemocí [4].

Na druhé straně jsou volné radikály nezbytné v mnoha důležitých dějích. Například jsou důležitým nástrojem enzymatických systémů, podílí se na detoxikaci v játrech, s pomocí leukocytů a makrofágů, pomocí peroxidace lipoproteinů buněčných stěn umožňují likvidaci nežádoucích mikroorganismů. Avšak důsledkem zvýšeného počtu volných radikálů se porušuje rovnováha a vzniká oxidační stres.

V posledních letech se v popředí studují nové zdroje antioxidantů, které by mohly být použity k přímé spotřebě nebo pro výrobu potravinových doplňků s cílem zvýšit nebo obohatit nutriční hodnotu potravin. Některé rostlinné extrakty jsou jedním z těchto zdrojů antioxidantů, které se po staletí používají v tradiční východní medicíně [4].

2.1.1 Klasifikace antioxidantů

Antioxidanty tvoří různorodou skupinu látek, jedno z možných rozdělení je následující.

- **podle funkce:** primární antioxidanty, sekundární antioxidanty, synergicky působící látky
- **podle původu** (způsobu vstupu do organismu): endogenní, exogenní
- **podle rozpustnosti:** hydrofilní, lipofilní, amfofilní
- **podle lokalizace:** intracelulární, extracelulární
- **podle molekulové hmotnosti:** nízkomolekulární, vysokomolekulární

- **podle původu:** přírodní, syntetické [5].

Přírodní antioxidanty jsou – lipofilní tokoferoly a tokotrienoly, karotenoidy a lecithin, hydrofilní kyselina askorbová, řada fenolických látek (flavonoidy, anthokyany), kyselina citronová a fytová. Materiály, které mají nedostatek přirozených antioxidantů a mají značný obsah oxylabilních složek (nenasycených lipidů), které mohou snadno podléhat autooxidaci, se kromě přirozených antioxidantů mohou doplňovat syntetickými antioxidanty. Mezi syntetické antioxidanty patří především fenoly, například estery kyseliny gallové, BHA (butylhydroxyanisol), BHT (butylhydroxytoluen), TBHQ (2-*terc*-butylhydrochinon) [2,5].

Primární antioxidanty mohou být označeny jako příjemci radikálů. Zpomalují nebo potlačují radikálovou fázi iniciace, anebo zastavují propagační stupeň autooxidace. Mezi primární antioxidanty se řadí všechny povolené látky (kyselina askorbová, kyselina erythorbová a jejich deriváty, tokoferoly, fenolové antioxidanty a galláty).

Sekundární antioxidanty působí prostřednictvím mnoha možných mechanismů. Zpomalují rychlost oxidace několika různými způsoby, ale nepřevádí volné radikály na stabilní produkty. Mohou doplňovat atom vodíku primárním antioxidantům, rozkládat hydroperoxidy na neradikální formy, deaktivovat či vychytávat singletový kyslík. Mezi sekundární antioxidanty se řadí například cystein, peptidy obsahující cystein, methionin, lipoová kyselina a další přirozené antioxidanty [2,5].

2.1.2 Přírodní antioxidanty

Řada rostlinných potravinářských materiálů vykazuje antioxidační vlastnosti. Antioxidační aktivita přírodních antioxidačních látek je zpravidla nižší než aktivita antioxidantů syntetických. Hlavním důvodem nižší efektivity přírodních antioxidantů je, že vlastní účinné látky v nich tvoří jen malou část.

Skupiny přírodních antioxidantů:

- jednoduché fenoly
- fenolové kyseliny a jejich deriváty
- lignany
- kurkuminoidy
- diterpeny a chinony
- triterpeny a steroly
- flavonoidy

Přírodní antioxidanty mají často omezené použití, neboť mohou vykazovat hořkou chuť nebo vůni po použitých rostlinách [2].

2.1.3 Charakteristika vybraných druhů látek

Sekundární metabolity rostlin představují velmi širokou skupinu látek s různými biologickými účinky od potenciálně toxických až po preventivně terapeutické. Jsou hlavními nebo vedlejšími účinnými látkami čerstvé rostliny či drogy. Množství i složení sekundárních metabolitů rostlin je rozdílné, liší se v jednotlivých částech rostlin a mění se v průběhu vývoje rostliny. Množství i rozložení sekundárních metabolitů je rozdílné v divoce rostoucích rostlinách a v pěstovaných rostlinách, liší se i mezi rostlinami téhož druhu. Rostliny jsou schopné tyto metabolity v sobě hromadit. Ukládají je v buňkách pletiv různých orgánů, jsou to - oddenky, hlízy, kořeny, cibule, semena, plody, listy, květy, natě a kůry [1].

2.1.3.1 Fenolové antioxidanty

K příznivě působícím látkám s antioxidačními, antibakteriálními, antimutagenními i protizánětlivými účinky patří fenolové sloučeniny, které se nacházejí zejména v ovoci, zelenině a bylinách. Jejich ochranný efekt je představován celou řadou vzájemně se doplňujících účinků přispívajících k vytvoření homeostáze. Narušení této rovnováhy například působením volných radikálů může vést k vzniku a rozvoji mnohých onemocnění jako je: ateroskleróza, diabetes nebo neurologické onemocnění [7].

Mezi fenolové antioxidanty se řadí různé látky s aromatickým jádrem, případně heterocyklickou strukturou s navázanými hydroxylovými skupinami či jinými substituenty. Jde o látky, které jsou schopné působit jako efektivní vazače oxidujících molekul. Mohou vázat nejen volné radikály, ale i přechodné kovy za vzniku chelátů a inhibovat enzymy katalyzující vznik volných radikálů [7].

Fenoly rostlin zahrnují: jednoduché fenoly, fenolové kyseliny (deriváty kyselin benzoové a skořicové), kumariny, flavonoidy, stilbeny, hydrolyzovatelné a kondenzované taniny, lignany a ligniny [2].

2.1.3.2 Polyfenoly

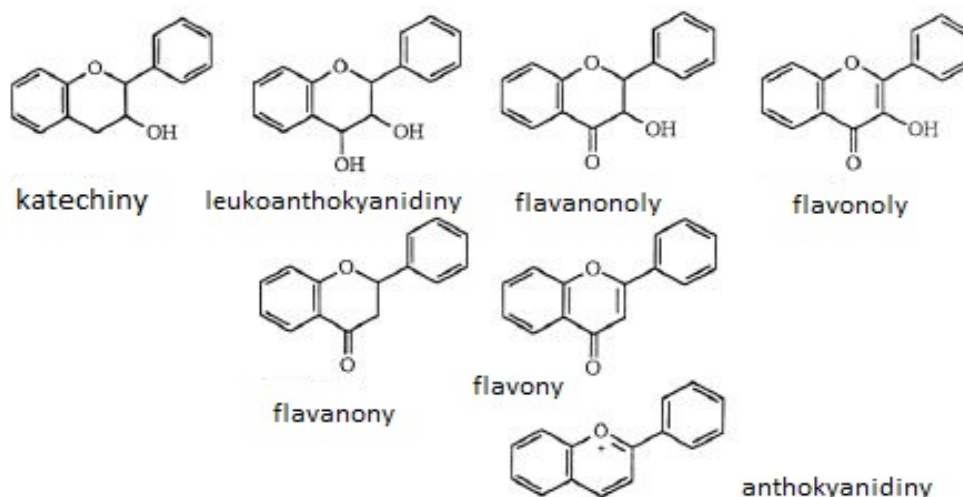
Polyfenolové sloučeniny tvoří jednu z nejpočetnějších a nejvíce zastoupených skupin rostlinných sekundárních metabolitů. Jedná se o obsáhlou skupinu látek, do které patří několik tisíc strukturně velmi různorodých fenolových sloučenin. Tyto sloučeniny obsahují ve své molekule dvě a více hydroxylových skupin navázaných na aromatické jádro. Polyfenolové látky jsou známy svou vysokou antioxidační a antimikrobiální aktivitou.

Zdrojem polyfenolických látek jsou zelenina, ovoce, čaj, víno, chmel, aromatické a léčivé rostliny. Hlavními skupinami polyfenolů jsou fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany [8,9].

2.1.3.3 Flavonoidy

Flavonoidní látky jsou rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů obsahujících v molekule dva benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem. Flavonoidy představují nejběžnější a široce distribuovanou skupinu rostlinných fenolických látek, které jsou dále rozděleny podle stupně oxidace C₃ řetězce a jeho substituce se rozeznávají následující struktury flavonoidů: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, flavonoly, anthokyanidiny. Jejich funkce v rostlinách zahrnuje s největší pravděpodobností ochranu před UV zářením [1,2].

Flavonoidní látky jsou primárními antioxidanty schopné zhaset hydroxylové a peroxidové radikály. Mohou tak působit uvnitř samotného organismu již od buněčné úrovně, ale také mimo organismus jako součást chemické interakce mezi organismy. Flavonoly a 5-hydroxysubstituované flavony vážou navíc kovy do neúčinných komplexů. Důležitý je pro antioxidační aktivitu flavonoidů počet hydroxylových skupin v molekule a jejich poloha. Aktivními sloučeninami jsou všechny dihydroxyderiváty s hydroxy skupinami v polohách C-3' a C-4'. Přítomnost další hydroxyskupiny v kruhu B antioxidační aktivitu dále zvyšuje. Naopak nízkou aktivitu vykazují flavonoidy s jednou hydroxyskupinou v kruhu B (např. flavanony naringenin a hesperedin). Dalšími důležitými funkčními skupinami jsou karbonylová skupina na C-4 a volná hydroxyskupina na C-3 (nebo C-5). Velmi účinné antioxidanty mají dvě hydroxyskupiny v *o*-poloze na jednom kruhu a dvě hydroxyskupiny v *p*-poloze na dalším kruhu. Mezi nejznámější flavonoidy patří rutin, kvercetin, citrin, hesperedin a další. Různé studie prokázaly protialergické, protizánětlivé a analgetické účinky flavonoidů včetně jejich schopnosti ovlivňovat přenos živin na kapilární úrovni [1,2].



Obr. č. 1 Obecná struktura hlavních flavonoidních látek

2.1.3.4 Lignany

Lignany jsou fytoestrogeny, které označují specifickou třídu dimerů a oligomerů fenyylpropanoidů. Je známo několik stovek lignanů, podle stupně oxidace skeletu se rozeznává několik skupin sloučenin. V potravinářských materiálech mají největší význam lineární lignany: diarylbutanoidy, lignanoidy, monoepoxylignany a bisepoxylignany.

Z přirozených lignanů jsou nejvýznamnějšími estrogenními sloučeninami matairesinol a sekoisolariciresinol, které se nacházejí v rostlinných materiálech ve formě glykosidů. V potravinách se tyto lignany nacházejí jako hlavní složky v obilovinách, rýži, luštěninách, ale i v ovoci a zelenině. Lignany hrají významnou roli v chemických interakcích mezi rostlinami a houbami, hmyzem nebo rostlinami navzájem, a to buď přímo, nebo formou synergismu s jinými rostlinnými látkami [2].

Flavonolignany obsažené v oplodí ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) mají hepatoprotektivní účinky. Nažky obsahují flavonoidy, kvercetin, taxifolin, především však flavonolignany (1,5 – 3%) jejichž směs je označována jako komplex silymarinu (směs silydianinu, silychristinu a silybinu) [1]. Biosyntéza flavonolignanů vychází z flavonoidů a fenyylpropanoidů [2].

Lignanům jsou přisuzovány určité antikancerogenní a estrogenní účinky.

2.1.3.5 Kurkuminoidy

Kurkuminoidy zahrnují skupinu substituovaných bis(hydroxycinnamoyl) methanových pigmentů, které se vyskytují v oddencích různých druhů rodu kurkuma (především *Curcuma longa*, *C. domestica*, *C. xanthorrhiza*, Zingiberaceae) v nichž jsou obsaženy v množství 3 - 6%. Hlavními sloučeninami jsou kurkumin, demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin. Mají zhášecí aktivitu pro superoxidový anion, peroxid vodíku, inhibují peroxidaci lipidů nejen v játrech, ale i v dalších tkáních, inhibují oxidaci LDL, mají protizánětlivý a antikancerogenní efekt. Nejúčinnější látkou z těchto diarylheptanoidů je tetrahydrokurkumin. Kurkumin a jeho deriváty lze použít v prevenci a léčbě ledvinových onemocnění, které jsou spojeny se zvýšením peroxidace lipidů [1].

2.1.3.6 Alkaloidy

Jsou heterocyklickými dusíkatými sekundárními metabolity. Většina alkaloidů jsou látky bezbarvé, pevné, krystalické a ve vodě málo rozpustné. Lépe rozpustné jsou ve slabě polárních a nepolárních rozpouštědlech. Ve vodě se rozpouštějí po převedení na soli reakcí s kyselinami.

Značné množství alkaloidů se vyskytuje v čeledi rostlin hvězdnicovitých, kam se řadí ostropestřec mariánský. Vyskytují se v různých částech rostlin, převážně jako směs příbuzných sloučenin. Mají značné biologické účinky zejména na nervový systém. Řada z nich se proto využívá jako léčiva ve farmacii. Podle struktury alkaloidů byla syntetizována řada příbuzných látek, které se uplatňují jako účinná léčiva. Rostliny si alkaloidy vytváří jako

součástí svých obranných mechanismů proti konzumentům. Mohou být zásobními formami dusíku, produkty detoxikace některých škodlivých dusíkatých sloučenin, případně regulátory růstu [5].

2.1.3.7 Glykosidy

Jsou hlavními sloučeninami v rostlinách, jedná se o deriváty cyklických forem monosacharidů (méně často oligosacharidů), ve kterých je vodík poloacetalového hydroxylu nahrazen substituentem různého charakteru. Takovým substituentem může být i další monosacharid. Takto vznikají homoglykosidy. V případě heteroglykosidů se na poloacetalový hydroxyl sacharidu váže glykosidickou vazbou necukerná složka nazývaná aglykon. Aglykonem mohou být nejrozličnější alifatické a aromatické látky. Je-li aglykon vázán atomem kyslíku (vazba -O-aglykon), glykosidy se označují jako O-glykosidy. Jako přirozené složky se v potravinách vyskytují také S-glykosidy neboli thioglykosidy. Příkladem těchto sloučenin jsou glukosinoláty. Dusíkaté analogy glykosidů jsou N-glykosidy (glykosylaminy). Vyskytují se jako přirozené složky potravin a vznikají v Maillardově reakci. Z charakteru vazby vyplývá, že glykosidy mají blokovaný poloacetalový hydroxyl. Jsou proto neredukující a neprojevuje se u nich mutarotace. Vesměs jsou rozpustné ve vodě. V zásaditém prostředí jsou stálé, zředěné kyseliny však způsobují hydrolýzu glykosidické vazby za vzniku volného sacharidu a aglykonu. Glykosidy jsou v rostlinách hojně rozšířeny. Některé se vyznačují hořkou chutí, sloužící jako součást chemické obrany proti konzumentům. Jiné mají výraznou vůni, takže se používají jako koření či ochucovadla, řada z nich má léčivé účinky [5].

2.1.3.8 Silice

Jsou složité směsi těkavých látek v přírodních rostlinných materiálech. Obsahují velké množství aktivních látek, jejichž účinky se vzájemně doplňují. Většinou jde o komplexní směsi monoterpenových uhlovodíků a jejich derivátů (alkoholů, esterů, ketonů), případně seskviterpenů s převahou jedné nebo několika málo složek, jsou nositeli různých farmakologických účinků. Jedním z těchto efektů je také antimikrobiální a antiinvazivní aktivita. Antibakteriální a antifungicidní aktivita silic a jejich obsahových látek je studována stále. Oddenky s kořeny kurkumy obsahují silice monoterpeny, které působí proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, kvasinkám i mikromycetám [1].

2.1.3.9 Olejoprskyřice

Jsou extrakty získané z koření nebo zeleniny organickými polárními rozpouštědly (methanol, ethanol, isopropylalkohol) i nepolárními rozpouštědly (hexan, petrolether). Po odpaření rozpouštědla z miscely zbývá olejoprskyřice. V poslední době se prosazuje šetrnější extrakce oxidem uhličitým. Většina olejoprskyřic obsahuje jako hlavní složky silice, přítomny jsou i další složky. Některé olejoprskyřice obsahují barviva příslušného koření (např. olejoprskyřice kurkumy) nebo pálivé látky (např. olejoprskyřice zázvoru). Samotné

olejoprskyřice nebo olejoprskyřice nanesené na vhodných nosičích se používají jako suroviny pro výrobu potravinářských aromat nebo místo přírodního koření k ochucování potravin. Olejoprskyřice kurkumy obsahují v 1 ml/kg silic minimálně 12,5 % kurkuminu [10].

2.1.3.10 Aromata

Hlavními složkami aroma koření jsou těkavé monoterpeny a seskviterpeny (různé uhlovodíky, alkoholy, aldehydy, ketony, estery), fenoly a od nich odvozené ethery. Celkový obsah silic se pohybuje v desetinách až jednotkách %. K nejdůležitějším materiálům pro výrobu přírodních potravinářských aromat patří silice, olejoprskyřice, výluhy, šťávy, dřeně a destiláty. Získávají se výhradně z rostlinných materiálů, čerstvých rostlin nebo sušených či jinak upravených částí rostlin [10].

2.1.3.11 Taniny (třísloviny)

Taniny jsou velkou skupinou přírodních polyfenolů přítomných v potravinách rostlinného původu, vytvářejí komplexy s celulózou, škrobem, alkaloidy a některými minerálními látkami. Při interakci s bílkovinami ústní dutiny vytvářejí sraženiny. Vyznačují se svíravou (trpkou, adstringentní) chutí. Dělí se na hydrolyzovatelné třísloviny - *gallotaniny* a *ellagotaniny*, jejichž základ tvoří kyselina gallová (digallová) nebo kyselina ellagová esterifikující glukosu za tvorby pentadigalloylglukosy. Druhou skupinou jsou kondenzované třísloviny - *katechinové* taniny, které vznikají na základě kondenzace pentahydroxyflavanu. Tyto látky mají dobré antioxidační účinky, antimikrobiální a rovněž antiinvazivní účinky [1].

2.1.3.12 Hořčiny

Jedná se o rostlinné látky různého chemického složení a výrazné hořké chuti. Lze je zařadit do skupiny glykosidů nebo alkaloidů. Velké množství hořkých rostlin resp. jejich částí (kořeny, oddenky, kůra, nať, listy aj.) se používají jako dietetické prostředky či léčiva. Používají se k výrobě různých nálevů či tinktur nebo jako koření sloužící k ochucování pokrmů. Rostliny čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*) kam se řadí i ostropestřec mariánský se využívají jako koření obsahující hořké seskviterpenové laktony odvozené od germakranu a eudesmanu (selinanu) [10].

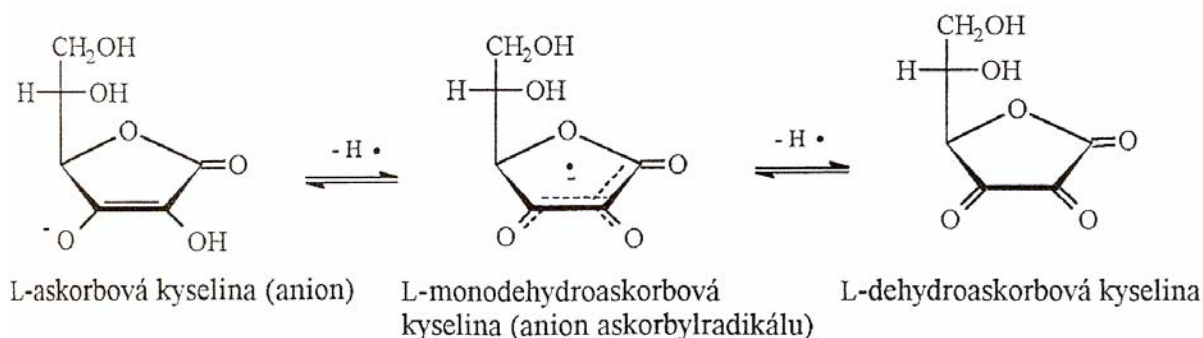
Jejich hořká chuť dráždí chuťové nervy a přímý kontakt hořkých látek se sliznicí žaludku a střeva vede ke zvýšení produkce trávicích šťáv. Zasahují povzbudivě do činnosti centrální nervové soustavy a v některých případech podporují tvorbu červených krvinek [1].

2.1.4 Vitaminy

Vitaminy jsou exogenní esenciální nízkomolekulární sloučeniny, heterotrofní organismus je syntetizuje jen v omezené míře a získává je především potravou. Vitaminy jsou v určitém minimálním množství nezbytné pro látkovou přeměnu a regulaci metabolismu člověka. Nejsou zdrojem energie, ani stavebním materiálem, ale vesměs mají funkci jako součást katalyzátorů biochemických reakcí. Vitamin C a tokoferoly jsou považovány za přírodní antioxidanty [10].

2.1.4.1 Vitamin C

Základní biologicky aktivní sloučeninou je kyselina askorbová. Ze čtyř možných stereoisomerů vykazuje aktivitu vitaminu C pouze L-askorbová kyselina (γ -lakton L-threo-2-hexenonové kyseliny). Názvem vitamin C se označuje nejen L-askorbová kyselina, ale také celý reversibilní redoxní systém. Ten zahrnuje L-askorbovou kyselinu, produkt její jednoelektronové oxidace (L-monodehydroaskorbová kyselina) a produkt dvouelektronové oxidace (L-dehydroaskorbová kyselina) [10].



Obr. č. 2 Biologicky aktivní formy vitaminu C

Vitamin C se podílí především na významných hydroxylačních reakcích probíhajících v organismu. Vitamin C působí jako kofaktor hydroxylace při konverzi prolinu na hydroxyprolin. Je potřebný k biosyntéze karnitinu. Dále se účastní biosyntézy mukopolysacharidů, prostaglandinů, absorpce iontových forem železa, jeho transportu, stimuluje transport sodných iontů, chloridových iontů a uplatňuje se v metabolismu cholesterolu [10].

Askorbát je nutný jako kofaktor enzymů při syntéze kolagenu a při přeměně dopaminu na noradrenalin. Kromě toho je důležitým redukčním činidlem, udržuje ionty železa a mědi v redukovaném stavu. Tím umožňuje vstřebávání železa a využití přechodných prvků v aktivním centru hydroxyláz. Velké množství vitaminu C se vyskytuje v krevní plazmě cca $40 - 140 \mu\text{mol.l}^{-1}$ [11].

Velmi důležité reakce, které souvisí s antioxidačními vlastnostmi vitamínu, jsou reakce s aktivními formami kyslíku, respektive s volnými radikály, a reakce s oxidovanými formami vitamínu E, které zabezpečují ochranu vitamínu E a lipidů membrán před oxidací. Ochrannou funkci má i pro labilní formy kyseliny listové. Inhibuje tvorbu nitrosaminů a působí tak jako modulátor mutogeneze a kancerogeneze [10].

Kyselina askorbová je obecně účinnějším antioxidantem použije-li se v kombinaci s tokoferoly. Ty potom přednostně reagují s volnými radikály lipidů, vzniklé radikály tokoferolů jsou na fázovém rozhraní tuk-voda redukovány zpět na tokoferoly kyselinou askorbovou [10].

Vitamin C je aktivní ve všech tělesných tkáních, napomáhá posilování buněčných stěn a vlásenec. Podporuje hojení povrchových ran a tím snižuje riziko vzniku krevních sraženin a hematomů. Vitamin C pomáhá při vstřebávání některých aminokyselin, větší množství ho potřebují ti, kteří drží redukční diety. Vyšší dávky vitamínu C dokážou blokovat účinky látek, které v těle vznikají jako odpověď na podráždění alergenů [12].

2.1.4.2 Vitamin E

Strukturním základem, který je společný všem sloučeninám vykazujícím aktivitu vitamínu E jsou tokol a tokotrienol, které obsahují chromanový kruh s nasyceným (tokoferoly) nebo nenasyceným (tokotrienoly) isoprenoidním postranním řetězcem. Jednotlivé tokoferoly a tokotrienoly se liší polohou a počtem methylových skupin v chromanovém kruhu [13].

K obecným zdrojům vitamínu E patří například rostlinné oleje. Potřeba vitamínu E v lidském organismu je dostatečně pokryta denním příjmem pestré stravy [13].

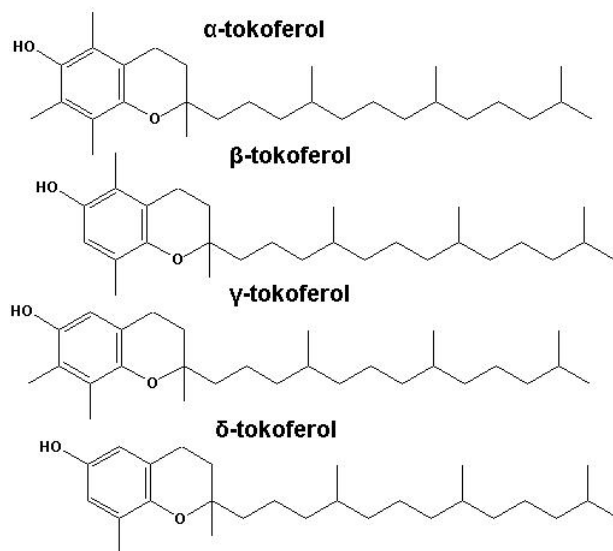
Vitamin E, zvláště α -tokoferol je významným lipofilním antioxidantem uplatňujícím se u eukaryotických buněk jako ochrana nenasycených lipidů před poškozením volnými radikály. α -tokoferol je všeobecně považován za nejúčinnější látku a jeho estery mají podobné účinky. β -tokoferol vykazuje asi 50% aktivity α -tokoferolu, γ -tokoferol asi 10% a δ -tokoferol zhruba 3% aktivity α -tokoferolu. Přítomnost dvojných vazeb v molekule tokotrienolů má za následek pokles biologické aktivity asi na třetinu ve srovnání s tokoferoly. Významnější biologickou aktivitu proto vykazují jen α -tokotrienol (asi 30% aktivity α -tokoferolu) a β -tokotrienol (asi 5% aktivity α -tokoferolu) [10,13]. Všechny formy vitamínu E jsou resorbovány v tenkém střevě [14].

Biologická aktivita vitamínu E je závislá především na hladině α -TTP (*α -tocopherol transfer protein*: jaterní přenašečový protein pro α -tokoferol), který je přítomen kromě jater ve většině tkání. Existují sdělení, že β -, γ -, a δ -tokoferol (a také tokotrienoly) mají velice omezenou systémovou biologickou aktivitu, protože se nepatrně váží na α -TTP, a tudíž jen málo přispívají k celkovému statusu vitamínu v organismu. Tokoferoly obecně působí antioxidačně ve většině tkání (přímo především v tkáních lipidních), taktéž působí protizánětlivě. Preventivně působí proti zhoubnému i nezhojnému bujení, zpomalují rozvoj některých neurodegenerativních chorob (Alzheimerovy choroby) a zvyšují imunitní odezvu organismu. Tokoferoly mohou tlumit poškození pokožky při jejím vystavení UV záření. Tokotrienoly

fungují jako lapače peroxylových radikálů, chrání polynenasycené mastné kyseliny ve fosfolipidových membránách a v lipoproteinech krevní plazmy před peroxidací lipidů. Po dlouhou dobu byly tokoferoly pokládány za nejsilnější lipofilní antioxidanty, ale v poslední době se objevují údaje o tom, že tokotrienoly jsou efektivnější inhibitory peroxidace lipidů i proteinů než α -tokoferol. Vyšší antioxidační aktivita tokotrienolů ve srovnání s α -tokoferolem je způsobena s největší pravděpodobností pohotovější interakcí chromanolového systému s reaktivními formami kyslíku, vyšší recyklační schopností chromanyloxylových radikálů tokotrienolů a rovnoměrnější distribucí těchto látek v buněčných membránách [14].

Vitamin E společně s β -karotenem a ubichinony chrání strukturu a integritu biomembrán, tzn. buněčné, cytoplasmové membrány (plasmolemy) a hlavně membrán vnitrobuněčných organel (buněčné jádro, mitochondrie, lysosomy, endoplazmové retikulum). Uplatňuje se také při ochraně lipoproteinů přítomných v plazmě. V krevním řečišti je transportován asociovaný s lipidovou fází lipoproteinových částic LDL (*Low Density Lipoproteins*). Každá částice LDL lipoproteinů obsahuje 6 molekul vitaminu E [10].

Adekvátní příjem vitaminu E se považuje za prevenci oxidace lipidů biomembrán. Vitamin E je proto faktorem zpomalujícím proces stárnutí organismu. Všechny formy vitaminu E jsou resorbovány v tenkém střevě, nejsou významné rozdíly mezi absorpcí α -tokoferolu, acetátu nebo sukcinátu [10].



Obr. č. 3 Struktura tokoferolů

2.2 Ostropestřec mariánský

Botanická charakteristika

Název rostliny: Ostropestřec mariánský

Latinský název rostliny: *Silybum marianum*

Název čeledi: Hvězdčovitě

Latinský název čeledi: *Astraceae*

Používaná část: semena (nažky), listy (použití v malé míře)

Významné obsahové látky: hlavními nositeli léčivých účinků jsou flavonolignany a polyfenoly, flavonoidy, glykosidy (zejména kvercetin, taxifolin a kemferol). Ostropestřec dále obsahuje biogenní aminy (tyramin a histamin), alkaloidy, saponiny, vitaminy (např. C a E). Doprovodné látky tvoří hořčiny a silice [15].

Ostropestřec je jednoletá případně dvouletá bylina dorůstající do výšky 50 - 150 cm, má silnou větvenou lodyhu s přízemními listy v růžici. Listy jsou vykrajované, ostře zubaté, tuhé a lesklé s bílými skvrnami. Ostropestřec kvete od června do září, jeho květy jsou červenofialové. Plody se sbírají od září do října a po jejich usušení se z chmýřitých hlavic vymlátí nažky, které se zpracovávají. Ostropestřec je původem ze Středomoří, Malé Asie a Kanárských ostrovů [16].



Obr. č. 4 Ostropestřec mariánský – květ, nažky s chmýřím

2.2.1 Chemické složení ostropestřce

Zelená část rostliny (která se používá k přípravě čajů) obsahuje:

- **Flavonoidy:** nejvýznamnější jsou glykosidy apigeninu, luteolinu a kemferolu
- **Steroly:** β -sitosterol (používá se v dietní léčbě vysokých hladin cholesterolu v krvi)
- **Organické kyseliny:** kyselina fumarová (3,3 %)
- **Hlavní hepatoprotektivní látka silymarin není v zelené části ostropestřce obsažena, je přítomna pouze v nažkách.**

Nažky rostliny obsahují:

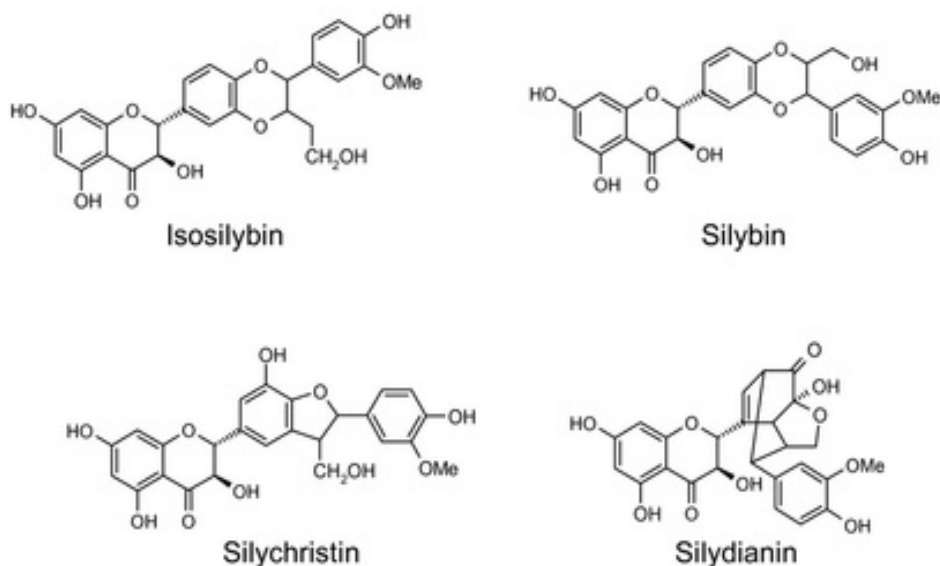
- **Flavonoidy:** hlavně apigenin, chrysoeriol, eriodictyol, naringenin, kvercetin a taxifolin.
- **Bílkoviny:** 26 - 28 %, zahrnují komplex aminokyselin se značným obsahem síry.
- **Oleje:** 25 – 35 %, s vysokým podílem nenasycených mastných kyselin, zejména kyseliny linolové (omega - 6).
- **Silymarin:** směs přírodních flavonolignanů 1,5 – 3 %.

Olej ostropestřce mariánského obsahuje z nenasycených mastných kyselin 55 - 72 % kyseliny linolové, 15 - 20 % kyseliny olejové, 0,23 % α - linoleové a 3,45 % arachidonové kyseliny. Obsah nasycených mastných kyselin se pohybuje v rozmezí 8 - 14 %, kde 5,28 % připadá na kyselinu stearovou, 8,47 % na kyselinu palmitovou a 2,67 % na kyselinu kapronovou. V oleji byl zjištěn také výskyt tokoferolu, který se pohybuje v rozmezí 500 - 800 mg/kg [17].

Ostropestřcový olej zůstává jako odpad při zpracování nažek pro farmaceutické účely. Svým složením nenasycených mastných kyselin a vysokým obsahem kyseliny linolové (omega - 6) nabízí využití pro potravinářský průmysl. V současnosti nachází částečné využití v kosmetice a při výrobě krmných směsí [18].

Sekundární metabolity nažky obsahují flavonolignany, což jsou látky příbuzné s lignany. Jejich biosyntéza vychází z flavonoidů (dihydroflavonolu jako je taxifolin neboli dihydrokvercetin) a fenyylpropanoidů, obvykle koniferylalkoholu. Flavonolignany jsou složky oplodí ostropestřce mariánského nazývané silymarin, z nichž 70 - 80 % představují strukturně příbuzné flavonolignany [2].

Aktivní komplex je lipofilní extrakt ze semen rostliny, skládá se ze čtyř flavonolignanů (silybin, isosilybin, silydianin a silychristin) souhrnně známý jako silymarin. Silybin je složka s největší mírou biologické aktivity, v komplexu silymarinu tvoří 50 - 70 %, jedná se o směs diastereoisomerů A a B v poměru přibližně 1 : 1 [19].



Obr. č. 5 Složky silymarinového komplexu

Jako koefektory působí další flavonolignany 2,3-dehydrosilybin a 2,3-dehydrosilychristin, dále taxifolin a 2,3-dihydroflavonol, které můžou sloužit jako typický marker pro plody ostropestřce [20].

Silymarinový komplex dále obsahuje biogenní aminy (tyramin a histamin v největší koncentraci se vykytují pod osemením) [21]. Na kvalitu silymarinového komplexu má vliv časová délka tvorby růžice přízemních listů. Čím déle se růžice tvoří, tím vyšší je obsah silymarinového komplexu [22].

Silymarinový komplex vykazuje chemoprotektivní aktivitu vůči chemickým, virovým, bakteriálním a fungálním toxinům, inhibuje lipidovou peroxidaci a stabilizuje membrány buněk jaterního parenchymu. Jeho biologická účinnost je zvýšena současným podáním fosfatidylcholinu. Snižuje projevy potíží gastrointestinálního traktu, které jsou spojeny s onemocněním jater [1].

2.2.2 Biologické účinky silymarinu

Při vstupu cizorodé látky do organismu a jejím vstřebáváním dochází k interakci této látky se složkami organismu. Probíhající procesy lze rozdělit do dvou fází - farmakokinetické (osud xenobiotika v organismu až k dosažení místa účinku) a farmakodynamické (reakce xenobiotika s receptory v místě působení, vyvolávající odpovídající biologický účinek).

Biochemické procesy farmakokinetické fáze sestávají z uvolnění účinné látky z aplikované formy, vstřebávání do krevního a lymfatického oběhu, rozdělení účinné látky v organismu, chemické přeměny a vyloučení [23].

Systémová biologická dostupnost silymarinu je limitována jeho nízkou rozpustností ve vodě, může být však zvýšena jeho komplexací s fosfatidylcholinem. V současné době je silymarin složkou řady fytopřípravků a doplňků stravy [24].

Protože se silymarin obtížně vstřebává v zažívacím traktu, používají se do kapslí nebo tablet se silymarinem fosfolipidy (fosfatidylcholin), které zvyšují stupeň vstřebávání silymarinu na desetinásobek. Lipofilní charakter silymarin-fosfatidylcholinového komplexu usnadňuje resorpci silymarinu přes biologické membrány v trávicím traktu [25].

Silymarin má hepatoprotektivní účinky, používá se při cirhóze, chronické hepatitidě, při léčbě gastrointestinálního traktu, pankreatu i po intoxikacích [26]. Ačkoliv nemá silymarin antivirové vlastnosti proti viru hepatitidy, podporuje syntézu bílkovin, pomáhá při regeneraci jaterní tkáně, reguluje zánět, zlepšuje glukuronidaci a chrání před vyčerpáním glutathionu [19].

Silymarin snižuje aktivitu jaterních enzymů a zlepšuje tak průběh jaterních nemocí, jakou je i steatóza jater. Steatóza je proces, ve kterém dochází k hromadění tukových částic v játrech, které mohou narušit jejich funkci a způsobit i nevratné poškození jater [25]. Steatózu vyvolávají následující příčiny:

- nadměrné požívání alkoholu (v tomto případě je steatóza jednou z forem alkoholického poškození jater)
- obezita
- vysoká hladina cholesterolu v krvi
- diabetes 1. a 2. typu
- užívání kortikoidů
- jedy muchomůrky zelené (toxiny amanitiny) [64].

Silymarin má ochranný efekt před možným poškozením jaterních funkcí hormonální antikoncepcí. Silymarin ovlivňuje procesy karcinogeneze a nádorového bujení, účinky byly popsány u rakoviny: prostaty, děložního čípku, prsu, tlustého střeva, slinivky břišní, plic, kůže, mozků [25].

Ostropestřec zpomaluje nádorový růst, je využíván k prevenci a léčbě rakoviny, především rakoviny prostaty a tlustého střeva [27,28]. Léčebný efekt byl popsán i u akutní lymfoblastové leukemie. U pacientů s nádorovým onemocněním se ostropestřec/silymarin podává pro jeho ochranné účinky před nepříznivými (toxickými) účinky chemoterapie.

Díky své polyfenolické struktuře je silymarin silným antioxidantem, funguje jako akceptor volných reaktivních radikálů [24], má schopnost inhibovat lipidovou peroxidaci, zvyšuje vylučování toxických látek z organismu [29] a stimuluje proteosyntézu [30].

Studie silymarinu z hlediska jeho účinků na hladiny cholesterolu, plazmových lipoproteinů a oxidovatelnosti LDL prokázaly, že silymarin podávaný současně s vysokocholesterolovou dietou brání rozvoji hypercholesterolemie a příznivě ovlivňuje distribuci cholesterolu mezi plazmovými proteiny; došlo ke snížení VLDL (very low density lipoprotein) a LDL (low

density lipoprotein), zvýšení HDL (high density lipoprotein). Silymarin snížil citlivost LDL na oxidaci, ale tento efekt byl limitován *in vivo* biologickou dostupností. Tyto výsledky naznačují možnost rozšíření indikace silymarinu jako hypocholesterolemika s LDL antioxidačním účinkem [31].

Taktéž se využívá v dermatologii a kosmetice, díky svým antioxidačním vlastnostem chrání pokožku před ultrafialovým zářením [32,33]. Přibližně 1 % hmotnosti v ostropestřcovém oleji tvoří fytosteroly. Tyto látky mají prokazatelné hydratační schopnosti bránící předčasnému stárnutí pokožky. Olej představuje bohatý zdroj přírodního vitaminu E a jeho derivátů. Flavonolignany obsažené v ostropestřci přispívají k vysokému antioxidačnímu potenciálu oleje, čímž ochraňují kůži a podporují její regeneraci. Díky svým dobrým vlastnostem se ostropestřcový olej přidává do mnoha dermatologických přípravků určených pro citlivou a podrážděnou pokožku novorozenců, dětí, osob trpících atopickým ekzémem a lupénkou [18].

2.3 Kurkuma

Botanická charakteristika

Název rostliny: Kurkumovník dlouhý

Latinský název rostliny: *Curcuma longa*

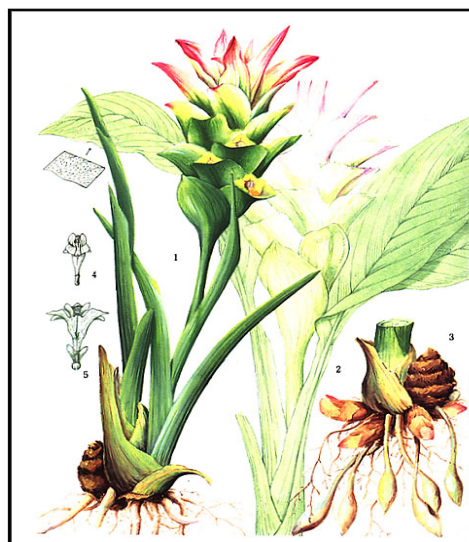
Název čeledi: Zázvorovité

Latinský název čeledi: *Zingiberaceae*

Používaná část: hlízovitý oddenek

Významné obsahové látky: kurkuminoidy (kurkumin, demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin), silice (éterické oleje), olejoprskyřice a škrob.

Jedná se o vytrvalou bylinu se zdužnatělými oddenky, dorůstá výšky jednoho metru. Z hlízovitého oddenku vyrážejí řapíkaté listy a vysoký stonek. Mezi listy vyrůstá hustý klas bledě žlutých kvítků. Plodem jsou mnohosemenné tobolky, které se ve zralosti samy rozevírají. Oddenek kurkumy se několik hodin vaří, poté se suší a následně pomele na sytě žlutý prášek. Mezi oblastí výskytu patří jižní a jihovýchodní Asie, Indie, Vietnam a Kambodža. Někdy se můžeme setkat s označením „indický šafrán“. Extrakt z oddenků této tropické rostliny je možné získat i z dalších tržních druhů kurkumovníku, kterých je známo asi 30 [34].

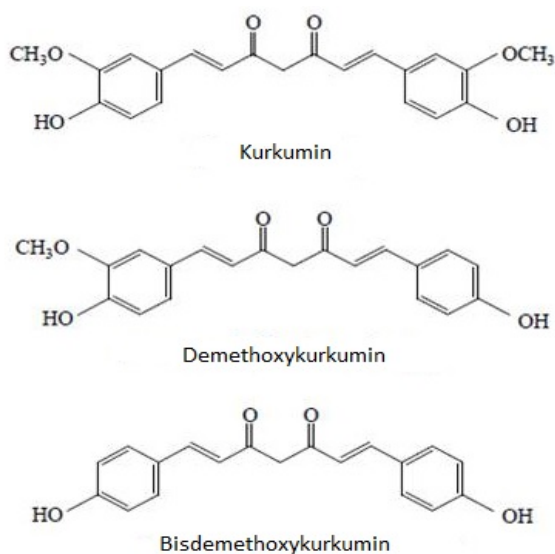


Obr. č. 6 Kurkumovník dlouhý - oddenek kurkumy, rostlina kurkumy

2.3.1 Chemické složení kurkumy

Hlízovité oddenky obsahují

- **Škrob:** 30 %
- **Silice:** jsou tvořeny seskviterpeny v obsahu 3 – 12 %, jejich zastoupení je následující: 30 % turmeron, 25 % *ar*-turmeron, 25 % zingiberen, 1,8-cineol, borneol a α -fellander [10].
- **Kurkuminoidy:** převládajícím pigmentem je kurkumin, v sušině oddenků tvoří 2 %. Dalšími pigmenty jsou demethoxykurkumin a bisdemethoxykurkumin v množství 0,6 % sušiny oddenku. Zastoupení pigmentů se může měnit podle původu a zralosti oddenků.



Obr. č. 7 Pigmenty kurkumy

Curcuma zedoaria poskytuje oddenek s obsahem seskviterpenů (beta-izomer seskviterpenu je perspektivní antitumorózní látkou).

Curcuma xanthorrhiza, oddenek obsahuje 40% škrobu, 12% silic, seskviterpeny (zingiberen, kurkumen) a barviva (kurkuminoidy) [1].

Kurkuma je nerozpustná ve vodě, ale dobře se rozpouští v alkoholu a v tucích. Pigmenty kurkumy jsou při obvyklých teplotách zpracování potravin prakticky stabilní, ale na světle, za přístupu vzdušného kyslíku a v alkalickém prostředí se rozkládají na nebarevné produkty. Biosyntéza kurkuminoidů je podobná biosyntéze fenylypropanoidů. Meziprodukty, jako jsou 4-coumaroyl-CoA kondenzují s malonyl-CoA za vzniku bisdemethoxykurkuminu. Kurkumin vzniká následnou oxidací a methylací [2].

2.3.2 Biologické účinky kurkuminu

Výzkum účinku kurkuminu je v dnešní době zaměřen na antioxidační účinky, protizánětlivé účinky, antikancerogenní a antimikrobiální účinky.

Kurkumin se využívá při léčbě kardiovaskulárních chorob, žilní trombózy, onemocnění trávicího traktu a jater, autoimunitních onemocnění pohybového aparátu – revmatoidní artritidě a osteoartritidě. Dále se využívá při autoimunitních onemocnění nervového systému – Alzheimerovy choroby a roztroušené sklerózy.

Kurkumin má nízkou biologickou dostupnost zapříčiněnou rychlým rozkladem ve střevní sliznici. Pro zvýšení účinnosti a vstřebatelnosti se vyrábí kapsle s obsahem sojového lecithinu. Předmětem mnohých studií je použití nanotechnologií, objevují se i studie zkoumající rozpouštění kurkuminu ve vodě s užitím polyvinyl pyrrolidonu. Účinnou možností je podávání kurkuminu společně s piperinem, který v těle dokáže zablokovat trávicí enzymy, které zpracovávají kurkumin. Více kurkuminu tak projde trávicím traktem a dostane se do krevního oběhu [35].

Kurkumin je silný antioxidant – vychytává kyslíkové volné radikály, účinkuje protizánětlivě a antikancerogenně.

Kurkumin:

- Napomáhá regulovat hladinu glutathionu v těle.
- Je důležitým intracelulárním antioxidantem.
- Je účinný při akutních i chronických zánětech.
- Při nádorových onemocněních působí na buněčné úrovni, brání transformaci zdravých buněk na nádorové, v některých případech může inhibovat růst rakovinových buněk.
- Působí v prevenci diabetu 2. typu, výrazně snižuje hladinu glukózy v krvi, podporuje správnou funkci slinivky břišní, která reguluje tvorbu inzulinu.

- Díky svým protizánětlivým účinkům napomáhá snížit poškození chrupavek a kloubů při revmatoidní artritidě. Může být součástí syntézy kolagenu, který zlepšuje funkci kloubů.
- Má pozitivní účinky při léčbě ulcerózní kolitidy.
- Pravidelné užívání kurkuminu snižuje možnost vzniku Alzheimerovy choroby [62].

Ejaz a kol. zjistili, že kurkumin je schopný potlačit angiogenezi v tukové tkáni, společně s jeho vlivem na metabolismus lipidů v adipocytech může přispívat ke snížení tělesného tuku a přírůstku tělesné hmotnosti. Toto zjištění naznačuje, že kurkumin může mít potenciální přínos v prevenci obezity [36]. Kurkumin také snižuje oxidační stres v bílých krvinkách způsobený pesticidy obsaženými v potravinách, tvrdí Ahmed a kol. [37].

Belcaro a kol. při své studii podávání kurkuminu při léčbě revmatoidní artritidy a osteoartritidy zjistili, že kurkumin účinně potlačuje aktivitu signálních molekul buněk na více úrovních, výsledkem je snížená tvorba zánětlivých látek a zamezení zánětlivého poškození kloubů [38]. Dále podle He a kol., doplňující podávání kurkuminu přispívá k lepšímu zdravotnímu stavu pacientů s rakovinou tlustého střeva [39]. Killian a kol. podrobně popsali mechanismus, kterým kurkumin potlačuje vznik metastáz u rakoviny prostaty a rakoviny plic [40].

Nakonec kurkuma má i kosmetické využití. Aplikace krému s obsahem kurkumy chrání před onemocněním kůže při radioterapii [41].

U kurkuminu byla zjištěna jak *in vitro*, tak *in vivo* určitá aktivita vůči *Herpes simplex viru* typu 2. Neméně účinná je také antimikrobiální aktivita těchto látek: například ethanolový extrakt z oddenků *Curcuma longa* je signifikantně efektivní vůči mikromycetám (*Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *Alternaria solani*) a bakteriím (například *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas pyocyanea*). Je potřeba vzít v úvahu, že se jednalo o studie *in vitro* a také skutečnost, že zmíněné látky jsou vysoce lipofilní (v hydrofilním prostředí organismu velmi málo rozpustné), obtížně přecházejí do tělních tekutin a mohou fungovat pouze extracelulárně. Vhodné transportní formy těchto látek jsou předmětem studií posledních let [1].

U obsahových látek kurkumy, respektive analogů kurkuminu byl prokázán inhibiční efekt na biotransformaci aflatoxinu B₁, což je velmi významné pro zvýšení bezpečnosti ne zcela čistých surovin přijímaných lidským i živočišným organismem [1].

2.4 Trávení

Trávicí soustava (gastrointestinální trakt, GIT) člověka je orgánová soustava, která zajišťuje příjem potravy, její mechanické a chemické zpracování, vstřebání živin a vyloučení nestrávených zbytků.

Při chemickém zpracování živin (vlastní trávení) se potrava chemicky štěpí na takové metabolity, které se mohou resorbovat a přejít do tělních tekutin. Jde v podstatě o hydrolytické štěpení složitých látek na menší molekuly (např. bílkoviny se štěpí na aminokyseliny, polysacharidy na monosacharidy, tuky na glycerol a mastné kyseliny).

Resorpce součástí potravy může probíhat ve všech částech trávicího ústrojí. Nejlepší podmínky pro resorpci však existují v tenkém střevě. Trávicími pochody uvolněné součásti potravy jsou zde již zpravidla ve stavu rozpustném ve vodě, což je jeden z předpokladů jejich dobré resorpce.

Resorpce součástí potravy uvolněných trávením je zajišťována různými mechanismy a probíhá u různých látek různou rychlostí. K pasivním mechanismům patří osmóza, difuze, nebo přechod po elektrochemickém gradientu. Aktivní transport vyžaduje dodání energie uvolněné metabolickými pochody. Tímto způsobem se přenášejí vstřebané látky nejrychleji. Produkty trávení sacharidů - monosacharidy - jsou resorbovány především v duodenu a jejunu. Rychlost resorpce monosacharidů je různá. Nejrychleji se vstřebávají glukóza a galaktóza. Bílkoviny potravy jsou při trávení rozštěpeny na jednotlivé aminokyseliny. Molekuly bílkovin nejsou vstřebávány, a proto neohrožují organismus jako cizí antigeny. Vstřebávány jsou pouze volné aminokyseliny a to buď aktivně, nebo pasivně. Nevelká část nestrávených bílkovin přechází do tlustého střeva, kde jsou štěpeny bakteriemi. Lipidy sice mohou volně procházet membránami, a proto nepotřebují aktivní transportní systém. Na druhé straně jsou však špatně rozpustné ve vodě a jejich trávení i resorpce ve vodném prostředí trávicí trubice i jejich transport plazmou je proto složitý a vyžaduje speciální mechanismy [42].

2.4.1 Žaludeční šťávy

Buňky žaludečních žláz produkují žaludeční šťávu. Ta obsahuje kromě vody řadu organických a anorganických látek. Z organických sloučenin jsou to jednodušší bílkoviny (albuminy, globuliny), složené bílkoviny (mucin) a enzymy (pepsin, katepsin, chymozin, lipáza). Z anorganických sloučenin je to především kyselina chlorovodíková, chloridy, sírany a fosforečnany. Kyselina chlorovodíková se tvoří v krcích buňkách žaludečních žláz. Výsledná acidita žaludeční šťávy závisí nejen na vylučování kyseliny chlorovodíkové, ale i od jejího slučování se složkami potravy, resp. s mucinem a solemi v žaludeční šťávě. Základní význam kyseliny chlorovodíkové tkví v aktivaci proenzymu pepsinogenu na proteolytický enzym pepsin. V žaludeční šťávě se vyskytuje také enzym lipáza. Buňky v krčku žaludečních žláz - mucinózní buňky - produkují bílkovinu mucin, který tvoří vrstvu a chrání stěny žaludku před poškozením kyselinou chlorovodíkovou. Jeho tvorba se musí

neustále obnovovat, protože průběžně přechází do žaludeční šťávy (ve šťávě žaludku jsou asi 3 % mucinu) [42].

2.4.2 Pankreatické šťávy

Slinivka břišní produkuje pankreatickou šťávu, která se vylévá do dvanáctníku společným vývodem se žlučovodem. Z anorganických látek obsahuje pankreatická šťáva zejména uhličitán sodný, který neutralizuje kyselou tráveninu žaludku. Z organických látek to jsou albuminy, globuliny, mucin, cholesterol, lipidy, močovina a pankreatické enzymy. Pankreatická lipáza hydrolyzuje neutrální tuky až na glycerol a mastné kyseliny. Její aktivitu zvyšují soli žlučových kyselin. Z proteolytických enzymů jsou v pankreatické šťávě zastoupeny: trypsin, chymotrypsin, karboxypeptidázy a elastáza. Vylučují se v inaktivní formě (trypsinogen, chymotrypsinogen, prokarboxypeptidáza, proelastáza). Trypsin vzniká z inaktivního trypsinogenu působením střevní enteropeptidázy. Chymotrypsin vzniká i inaktivního chymotrypsinogenu působením aktivního trypsinu. Karboxypeptidáza vzniká z inaktivní prokarboxypeptidázy působením trypsinu [42].

2.4.3 Žlučové šťávy

Základní funkcí jater je:

- tvorba žluči, která má jako emulgátor zásadní význam při trávení lipidů
- ukládá se zde glykogen a vytvářejí ketolátky
- tvoří se zde bílkoviny krevní plazmy
- vzniká zde močovina při rozpadu aminokyselin
- detoxikuje se zde řada škodlivých látek
- jsou důležitým orgánem termoregulace

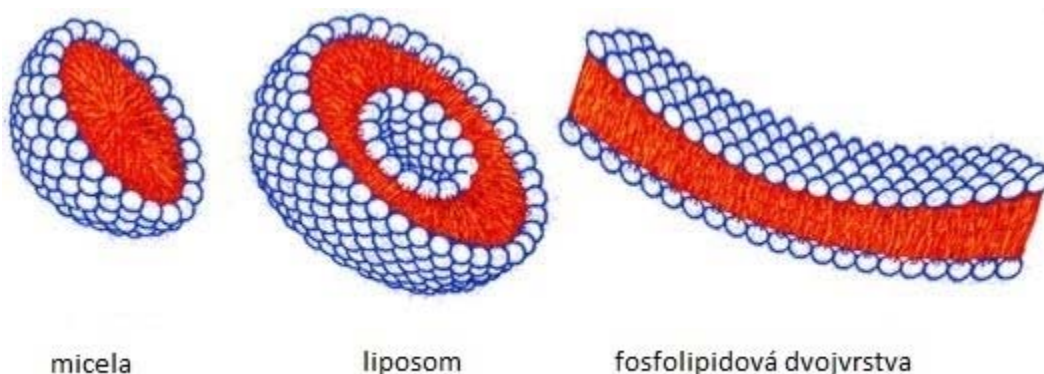
Z organických látek jsou ve žluči důležité žlučové kyseliny a jejich soli, žlučová barviva, cholesterol, lecitin, tuky, mastné kyseliny, močovina, alkalická fosfatáza, mucin. Některé organické složky (zejména žlučové kyseliny) se zpětně resorbují ze střeva, vrací se portální (vrátnicovou) žílou do jater a opět se do žluče vylučují. Jde o tzv. enterohepatální oběh. Žlučové kyseliny snižují povrchové napětí v roztocích a umožňují tak vytváření emulze. To je významné především při vstřebávání lipidů. Žlučová barviva jsou bilirubin a biliverdin. Tato barviva vznikají po rozpadu hemoglobinu. Cholesterol nemá význam při trávení, ale spolupůsobí při vytváření emulze tuků. Z anorganických látek je ve žluči přítomen chlorid sodný a draselný, fosforečnan hořečnatý a vápenatý, ionty železa a mědi. Důležitou anorganickou složkou jsou uhličitany a fosforečnany, které snižují aciditu ve dvanáctníku [42].

2.5 Enkapsulace

Enkapsulace je proces při kterém dochází k zapouzdření aktivní látky do nosného materiálu. Aktivní látkou mohou být vitamíny, antioxidační látky nebo minerální látky. Enkapsulací vznikají malé kapsle, jejichž pomocí může být aktivní látka transportována do potravin, kde se uvolňuje regulovanou rychlostí, nebo do zažívacího traktu. Díky tomu je tato metoda využívána zvláště v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Enkapsulované částice mají velikost v řádech nm – mm [43]. Materiály používané k enkapsulaci musí být požitelné, biodegradabilní a schopné utvořit membránu mezi jádrem částice a okolím. Nejčastěji se k balení aktivní látky používají polysacharidy, proteiny, lipidy, rostlinné gumy (arabská guma), mořské extrakty (alginát), přírodní vosky a jiné. Jedním z hlavních důvodů enkapsulace aktivních látek je vytvoření stability během zpracování a ve finálních produktech. Výhodou procesu enkapsulace je tedy ochrana aktivní látky před její interakcí s maticí potravin během zpracování a skladování. Enkapsulace maskuje nepříjemnou chuť a aroma aktivní látky [43,44].

2.5.1 Liposomy

Liposomy jsou uměle připravované částice. Membrány liposomů jsou tvořeny fosfolipidy, tato membrána obklopuje vnitřní prostor vyplněný vodným roztokem. Při přípravě liposomů dochází k vzájemnému působení hydrofilní a hydrofobní části ve vodném prostředí a tím dojde k zapouzdření. Nejčastěji jsou tyto lipidové částice připravovány z lecithinu a cholesterolu [45,46]. Liposomy jsou částice, které zvyšují stabilitu aktivních látek v těle nebo v potravinách. Do jejich vnitřní části se enkapsulují aktivní látky rostlinných extraktů či léčiv. Pomocí liposomů se dopravují aktivní látky na místo určení. Nevýhodou některých liposomů je, že nedojde k vyloučení aktivní látky z liposomu na požadované místo v těle, liposomy jsou společně s aktivní látkou vyloučeny z těla bez požadovaného účinku [43].



Obr. č. 8 Struktura liposomů

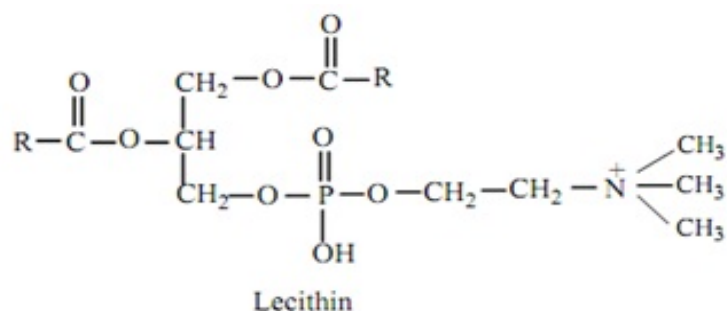
2.5.1.1 Příprava částic

Liposomy lze připravit odpařením reverzní fáze, pomocí zmrazení a vysušení, pomocí ultrazvuku, či vysokotlaké homogenizace. Nejjednodušší metodou pro získání malých liposomů je injekční ethanolová metoda [47,48].

- **Ultrazvuková metoda** – existují dva postupy, kterými lze liposomy připravit. První metodou je sonifikace pomocí sondy, která je vhodná pro malé objemy. Druhou metodou je ozvučení liposomů v sonifikační lázni [49,50].
- **Odpařování na tenké vrstvě s reverzní fází** – principem metody je vakuové odpaření organického rozpouštědla z baňky. Na stěnách baňky se po odpaření vytvoří fosfolipidový film, který se hydratuje ve vodném prostředí. Třepáním je film převeden na částici s malým enkapsulačním objemem. Pro zlepšení účinku se film připravuje v přítomnosti látky, která má být enkapsulována [50].

2.5.1.2 Lecithin

Termín lecithin se používá pro fosfatidylcholin i pro směs přírodních fosfolipidů používaných jako emulgátory. Hlavním zdrojem lecithinu je surový sójový olej (obsahuje 1 - 3 % lecithinu), při jehož rafinaci se lecithin získává. Méně významnými zdroji jsou další rostlinné oleje a vejce. Hlavní složkou sójového lecithinu je fosfatidylcholin, dále je přítomen fosfatidylserin a fosfatidylinositol. Využití lecithinu je různé: menší část se zkrmuje a jeho větší část se používá jako emulgátor v potravinářském průmyslu [51].

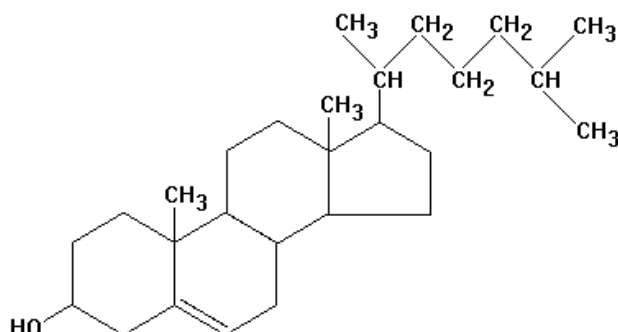


Obr. č. 9 Struktura lecithinu

2.5.1.3 Cholesterol

Cholesterol se řadí do skupiny steroidů, tvoří složku buněčných membrán. Je prekurzorem pro tvorbu steroidních hormonů. Cholesterol je složen z izoprenových jednotek. Jeho syntéza

i zpracování probíhá v játrech, kde je následně přeměněn na žlučové kyseliny. Ve formě žlučových kyselin lze cholesterol z těla vyloučit [52].



Obr. č 10 Struktura cholesterolu

2.6 Metody stanovení

2.6.1 Stanovení antioxidační aktivity

Aerobní organismy jsou existenčně závislé na kyslíku, současně jsou vystaveny negativním účinkům reaktivních forem kyslíku tzv. volným radikálům a dalším sloučeninám, které vznikají jako vedlejší produkty oxidačního metabolismu. Živé organismy disponují komplexním systémem antioxidační ochrany. Rostlinná tkáň je bohatá na většinu typů antioxidantů, které posilují náš antioxidační systém [53].

Volným radikálům, které vznikají *in vivo* a mají řadu fyziologických funkcí je v současné době věnována velká pozornost. Sleduje se jejich negativní působení na organismus při řadě onemocnění. Jde především o reaktivní kyslíkové radikály a dusíkové radikály, které působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny. Reaktivní radikály pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci. Kaskáda reakcí, která je iniciována volnými radikály následně vede ke změnám ve struktuře buněk, k poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí organismu. Vzhledem k tomu, že reparativní procesy v organismu nemohou samy plně eliminovat poškození biomolekul, hraje významnou roli při ochraně před volnými radikály redukce příčin jejich vzniku [54].

Celková antioxidační kapacita – TAA (total antioxidant activity) je termín, který charakterizuje souhrnnou koncentraci všech látek s antioxidačními účinky ve vzorku [11].

2.6.1.1 Metody založené na eliminaci radikálů

Spočívají v hodnocení schopnosti vzorku vychytávat volné radikály. Radikály mohou být v reakční směsi generovány nebo jsou do reakční směsi přidávány [54].

- **Metoda využívající DPPH**

Metoda DPPH je jednou ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity směsných vzorků i čistých látek. Antioxidační látky mohou být rozpustné ve vodě, rozpustné v tucích, nerozpustné nebo vázané na buněčné stěny a proto nemusí být volně k dispozici pro reakci s DPPH. Extrakční činidlo je tedy důležitým faktorem při kvantifikaci antioxidační aktivity potravin [55].

Metoda spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazylem - DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenyl-pikrylhydrazin). DPPH• vykazuje silnou absorpci v UV-VIS spektru. Při této metodě se po redukci antioxidantem nebo radikálem roztok odbarví.

Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky při vlnové délce 517 nm po uplynutí určitého konstantního času. Reakci je možno sledovat i metodou elektronové spinové rezonance (ESR) nebo HPLC. Použití detekce HPLC, při které je hodnocen pík radikálu DPPH, je výhodné zvláště u barevných vzorků, kdy se na rozdíl od spektrofotometrie zabarvení vzorku eliminuje. U směsných vzorků se radikálová aktivita někdy vyjadřuje v ekvivalentech askorbové kyseliny nebo v jednotkách standardu Troloxu [54].

- **Metoda TEAC (metoda používající ABTS)**

Metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) využívá činidel, která iniciační akcí jiné látky přechází ve svou radikálovou formu, která je barevná a relativně stabilní. V přítomnosti antioxidačně aktivních složek extrahovaných ze vzorku potravin se redukuje, a tím odbarvuje. Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku [56].

Je jednou z nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity TAA. Testuje schopnost vzorku či látek zhaset kation-radikál ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). ABTS je peroxidásový substrát, který reakcí s peroxylovými radikály nebo jinými oxidanty vytváří v přítomnosti H₂O₂ metastabilní kation-radikál ABTS^{•+}, který má absorpční viditelné oblasti 600 – 750 nm, roztok je zbarven zeleno-modře. Antioxidační aktivita může být snadno stanovena spektrofotometricky. Nejčastěji se měření provádí při 734 nm [54,57].

V reakční směsi se kation-radikál ABTS^{•+} generuje oxidací ABTS. Převážně je používán systém ABTS/H₂O₂/peroxidasa nebo ABTS/methmyoglobin/H₂O₂. Možná je i chemická oxidace ABTS např. peroxodisíranem draselným nebo oxidem manganičitým. Při vlastním experimentálním měření se užívají dva postupy. V prvním se antioxidant přidává do reakční směsi, ve které byl již vytvořen radikál ABTS^{•+}, při druhém postupu je antioxidant v reakční směsi přítomen při generování radikálu ABTS^{•+}. Častěji se užívá uspořádání, při němž se antioxidant přidává k radikálu ABTS^{•+} již vyprodukovanému pomocí peroxidasy.

K hodnocení TAA vzorků se využívá parametr TEAC, jež označuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu Troloxu [54].

- **Metoda ORAC**

Při použití metody ORAC (oxygen radical absorbance capacity) se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence β -fykoerythrinu (β -PE) po ataku radikály. Pro generaci peroxylových radikálů se používá AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydro-chlorid), zatímco hydroxylové radikály se generují systémem $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^{2+}$.

Při stanovení antioxidační kapacity polyfenolů byla objevena jistá omezení, která se týkají vlastností β -PE (např. omezená fotostabilita) [54].

- **Metody lipidové peroxidace**

Lipidová peroxidace vyvolaná volnými radikály je jedním z nejvýznamnějších patologických pochodů v organismu. Látky potlačující lipidovou peroxidaci mohou eliminovat jak iniciační kyslíkové radikály ($\text{OH}^\bullet$), tak sekundárně vznikající radikálové meziprodukty (peroxyl, alkoxyl) a mohou též působit jako látky chelatující ionty přechodných kovů. Metod hodnotících vliv antioxidantů na lipidovou peroxidaci bylo vyvinuto mnoho. Častým postupem je užití fosfolipidových liposomů. Jinou možností je studium na mikroorganismech. Další modifikací je sledování lipidové peroxidace na tkáňových homogenátech, mitochondriích nebo LDL částicích (low-density lipoproteins). Jednou z nejpoužívanějších metod k hodnocení schopnosti látek eliminovat lipidovou peroxidaci je metoda TBA – MDA. Je založena na stanovení jednoho ze sekundárních produktů lipidové peroxidace malondialdehydu (MDA) na základě jeho barevné reakce s kyselinou thiobarbiturovou (TBA), měří se absorbance při 532 nm [54].

2.6.1.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Nízkomolekulární antioxidanty charakterizujeme mimo jiné jako redukční činidla, která reagují s oxidanty, redukuje je, a tím je inaktivují [54].

- **Metoda FRAP**

Metoda FRAP (ferric reducing antioxidant potential) je založena na redukci železitých komplexů jako je Fe^{3+} -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) (Fe^{3+} -TPTZ), ferrikyanid aj., které jsou téměř bezbarvé, po redukci a případné reakci s dalším činidlem vytváří barevné produkty, jakým může být například berlínská modř. Nárůst absorbance při 593 nm odpovídající množství komplexu Fe^{2+} -TPTZ je mírou antioxidační aktivity vzorku. Limitem metody je, že měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH (3,6). Nejsou zachyceny polyfenolické látky, které reagují s komplexem pomalu [54,63].

- **Metoda HPLC s elektrochemickou detekcí**

Elektroaktivní látky je možné velmi přesně detegovat použitím amperometrických nebo coulochemických detektorů při analýze HPLC (HPLC-ECD). Při HPLC-ECD se na pracovní elektrodu detektoru vkládá určitý kladný potenciál. Pík látky se projeví pouze tehdy, je-li látka při tomto potenciálu oxidována. Látku je tak možné charakterizovat nejen retenčním časem, ale také potenciálem, při kterém se oxiduje. To umožňuje analyzovat komplexní směsi a identifikovat v nich jednotlivé účinné antioxidační komponenty na základě hodnoty potenciálu aplikovaného na elektrodu [54].

2.6.2 Stanovení celkového obsahu polyfenolů

Díky své jednoduchosti a nízkým ekonomickým nákladům se ke stanovení celkových polyfenolů používají především spektrofotometrické metody.

Jednou z nejvyužívanějších metod je Folin-Ciocalteuho spektrofotometrická metoda, která je založena na reakci látek směsi FC činidla, fosfomolybdenanu a fosfowolframanu s fenoly obsaženými v rostlinném extraktu. Principem metody je redukce fenolů za současného vzniku chromogenů (modrých produktů). Intenzita zbarvení měřena spektrofotometricky při 750 nm představuje celkový obsah fenolů. Výsledná hodnota koncentrace fenolových sloučenin ve vzorku je získána přepočtem na ekvivalentní množství kyseliny gallové. Metoda je označována jako GAE (gallic acid equivalent) [58].

2.6.3 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Jednou z nejpoužívanějších analytických metod pro stanovení celkového obsahu flavonoidů v rostlinných extraktech je Christ-Müllerova metoda. Principem metody je spektrofotometrická detekce barevných komplexů Al^{3+} s hydroxylovou a karbonylovou skupinou v alkalickém prostředí. Praktické provedení zahrnuje reakci s hlinitou solí, dusitanem a následné zalkalizování vzorku. Výsledný roztok je v přítomnosti flavonoidů zbarven žlutě. Intenzita zbarvení je měřena spektrofotometricky při 510 nm. Hodnota koncentrace flavonoidů ve vzorku je získána přepočtem, který vychází z kalibrační křivky katechinu [53,59].

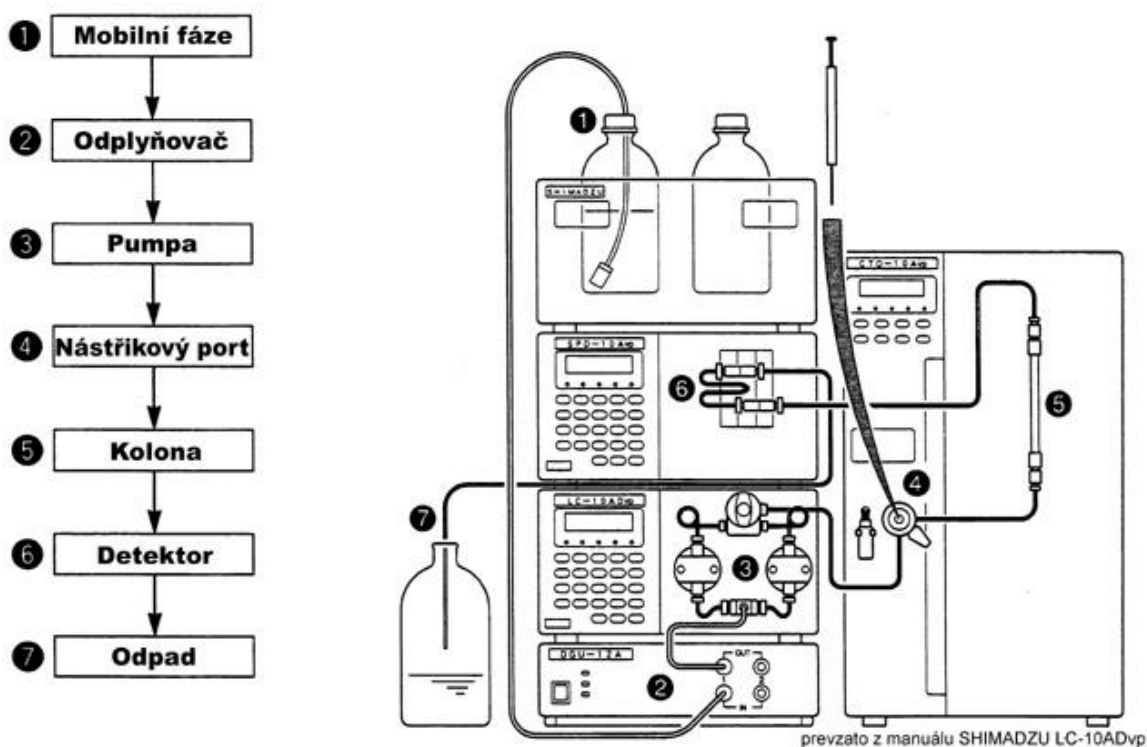
2.6.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC

Chromatografie je separační proces, při kterém se látky rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze, pohyblivou (mobilní fází) a nepohyblivou (stacionární fází), na základě fyzikálně-chemických interakcí jako jsou adsorpce, iontová výměna a podobně. Při průchodu kolonou každá molekula vzorku přejde mnohokrát z proudu mobilní fáze na povrch sorbetu a zpět. V každém okamžiku musí být systém blízko rovnováhy, kdy se počet sorbovaných molekul přibližně rovná počtu molekul resorbovaných. Chromatografická kolona je však dynamický systém, který nikdy nemůže dosáhnout skutečné rovnováhy. Doba, kterou průměrná molekula určité

složky setrvává na povrchu sorbetu, závisí na velikosti interakce mezi složkou a sorbetem, Intenzita interakce určuje pořadí, v jakém složka vychází z kolony. Čím větší je interakce, tím později složka vychází – tím má větší retenční čas [60].

HPLC je separační metoda, která se využívá k rozdělování směsí a následnému stanovení jednotlivých složek směsi vhodnou metodou. Tato metoda má velmi široké použití, vyznačuje se rychlostí a vysokou citlivostí. HPLC se řadí do sloupcové chromatografie. Sloupec obsahuje stacionární část, která je spojena s vhodnou matricí umístěnou do kovové kolony, a pohyblivou část procházející kolonou. Průchod mobilní fáze není samovolný, je nutné použít čerpadla. Látky se v koloně separují eluční technikou, kdy je analyzovaná směs jednorázově vnášena do proudu mobilní fáze. Podmínkou úspěšné separace je, aby složka vzorku byla stacionární fází zdržována silněji, než složky mobilní fáze. Jednotlivé složky jsou eluovány v pořadí rostoucí velikosti interakce se stacionární fází a jsou odděleny čistou mobilní fází [60].

Blokové schéma HPLC



Obr. č. 11 Blokové schéma HPLC

3 CÍLE

Cílem diplomové práce je stanovení biologicky aktivních látek ve vybraných přírodních rostlinných extraktech.

V rámci práce jsou řešeny následující dílčí cíle:

- zpracování literární rešerše zaměřené na aktivní látky ve vybraných přírodních extraktech a jejich biologické účinky (sacharidy, fenolické látky, vitaminy, látky s antioxidačním účinkem případně antimutagenním účinkem)
- využití moderních metod analýzy a identifikace aktivních látek ve vybraných přírodních extraktech (ostropestřec mariánský x kurkuma)
- testování účinnosti aktivních látek z extraktů v modelových fyziologických podmínkách.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Použité chemikálie

ABTS: 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina), Sigma - Aldrich (DEU)

Acetonitril pro HPLC, Sigma - Aldrich (DEU)

Bile salts - směs kyseliny cholové a deoxycholové, Sigma - Aldrich (DEU)

Curcumin, Sigma - Aldrich (DEU)

Diethylether, VWR (USA)

Dusitan sodný, Vitrum - LachNer (CZE)

Ethylalkohol pro UV-VIS, Vitrum - LachNer (CZE)

Folin - Ciocalteuovo činidlo, Serva (DEU)

Hydrogenuhličitan sodný, Vitrum - LachNer (CZE)

Hydroxid draselný, Vitrum - LachNer (CZE)

Hydroxid sodný, Vitrum - LachNer (CZE)

Chlorid hlinitý, Vitrum - LachNer (CZE)

Cholesterol, Sigma - Aldrich (DEU)

Katechin, Sigma - Aldrich (DEU)

Kyselina fosforečná, Vitrum - LachNer (CZE)

Kyselina gallová, Sigma - Aldrich (DEU)

Kyselina chlorovodíková 35%, Vitrum - LachNer (CZE)

Kyselina octová 98%, Vitrum - LachNer (CZE)

Lecithin ze sóje, Serva (DEU)

Methanol pro HPLC, Sigma - Aldrich (DEU)

Octan sodný, Vitrum - LachNer (CZE)

Pankreatin z vepřové slinivky, Sigma - Aldrich (DEU)

Pepsin z prasečí žaludeční sliznice, Sigma - Aldrich (DEU)

Peroxodisíran draselný, Sigma - Aldrich (DEU)

Silymarin, Sigma - Aldrich (DEU)

Uhličitan sodný, Vitrum - LachNer (CZE)

TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), Sigma - Aldrich (DEU)

4.1.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco (DEU)

Centrifuga U-32R, Boeco (DEU)

Ultrazvukový homogenizátor Sonopuls HS3200, Bandeline (DEU)

Ultrazvuková lázeň PS02000 (CZE)

UV/VIS spektrofotometr Helios γ , Unicam (GB)

Vakuová odparka Werke RV06-ML, Ika (DEU)

Vortex TK3S, Kartell spa (DEU)

Sestava HPLC/PDA ThermoFisher Scientific (USA)

- programátor gradientu Ultimate 3000
- fotometrický detektor Ultimate 3000 DAD
- vysokotlaké čerpadlo LCP 4020
- dávkovací analytický ventil smyčkový C R54157
- termostat kolon LCO 101
- kolona Supelcosil TM LC-NH2 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Sestava HPLC/PDA Thermo Finnigan SURVEYOR (USA)

- pumpa – MS Pump Plus
- detektor PDA – puls detector
- termostat LCO 101
- dávkovací analytický ventil smyčkový C R54157
- chromatografická kolona Kinetex 5u C18; 4,6 x 150 mm

4.2 Vzorky

Všechny vzorky určené k analýze byly skladovány v temnu při laboratorní teplotě. Analyzovány byly následující rostlinné extrakty.

Ostropestřec mariánský

- Ostropestřec plod (fructus cardui mariae), doplněk stravy



Obr. č. 12 Analyzované plody ostropestře

- Kapsle Silymarin Premium, Dr. Max, doplněk stravy

Pro normální funkci jater a metabolismus tuků. Kapsle obsahuje 200 mg silymarinu a 82,5 mg cholinu



Obr. č. 13 Analyzované kapsle Silymarin Premium

- Ostropestřec kapky, doplněk stravy

Složení tinktury: voda, jemný líh (obsah lihu je min. 35 obj. % alkoholu), ostropestřec mariánský standardizovaný extrakt, vitamin C (kyselina L-askorbová). V objemu 1 – 2 ml je obsaženo 75 – 150 mg standardizovaného extraktu ostropestřce a 12,5 – 25 mg vitaminu C.



Obr. č. 14 Analyzované kapky ostropestřce

- Ostropestřec olej Harmonic series, doplněk stravy

Za studena lisovaný 100 % ostropestřcový olej, první lis.



Obr. č. 15 Analyzovaný ostropestřcový olej

Kurkuma

- Oddenek kurkumovníku dlouhého, původem z Vietnamu



Obr. č. 16 Analyzovaný oddenek kurkumy

- Kurkuma mletá, sušená, koření původem z Vietnamu
- CurcumaNan, nanoprášek kurkumovníku dlouhého, původem z Vietnamu

Nanoprášek byl získán z kurkumovníku dlouhého následujícím způsobem: z 10 kg oddenku kurkumy byl sušením získán 1 kg prášku, který obsahuje 2,3 g nanokurkuminu.



Obr. č. 17 Analyzovaný nanokurkumin

- Pro enkapsulaci byly použity účinné látky standardu silymarin a kurkumin. Standardy byly uchovávány v temnu při teplotě -18 °C.

4.3 Příprava vzorků

4.3.1 Úprava vzorků pro úvodní charakterizaci

Přírodní extrakty byly pro úvodní skupinovou charakteristiku upraveny takto: Přesně odvážené množství 1 g plodu ostropestřce a 0,1 mg nanokurmukinu bylo rozpouštěno ve směsi ethanol-voda v poměru 2:3. Stejným způsobem byly připraveny vzorky oddenku kurkumy, kapslí, tinktury i oleje ostropestřce. Takto připravené vzorky byly následně přefiltrovány, maceráty a extrakty byly použity ke stanovení celkového obsahu polyfenolů, celkového obsahu flavonoidů a k určení antioxidační aktivity.

4.3.2 Úprava vzorků pro stanovení kyseliny askorbové

Obsah kyseliny askorbové byl stanovován v ostropestřci (plody, tinktura, olej) a v oddenku kurkumy. Analyzované vzorky v množství 1 g rozdrčených plodů/oddenku a 1 ml oleje byly extrahovány 10 ml 2 % kyseliny metafosforečné po dobu 15 minut. Takto připravené vzorky byly přefiltrovány pomocí membránového filtru a byly nastříkovány na kolonu HPLC. Tinktura byla analyzována přímo bez předchozích úprav.

4.3.3 Úprava vzorků pro stanovení tokoferolu

Obsah tokoferolu byl stanovován v plodech ostropestřce a oddenku kurkumy. Před samotným stanovením bylo nutné optimalizačně upravit postup metody stanovení [61]. Pro analýzu byl použit 1 g plodu/oddenku, který byl rozdrčen a zmýdelňován v 10 ml KOH, při teplotě 80 °C po dobu 30 minut. Po zmýdelnění bylo přidáno několik ml diethyletheru. Ten byl ze směsi odpipetován do odpařovací baňky a na vakuové odparce byl odpařen do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml methanolu, přefiltrován pomocí membránového filtru a nastříknut na kolonu HPLC.

4.3.4 Úprava vzorků pro stanovení účinné látky

Pro analýzu byly použity plody ostropestřce a oddenek kurkumy, 1 g vzorku byl rozpuštěn v methanolu. Pomocí membránového filtru byly vzorky přefiltrovány a nastříknuty na kolonu HPLC.

4.3.5 Úprava vzorků pro kyselou hydrolýzu účinné látky

Pro analýzu byl připraven zásobní roztok standardu silymarinu o koncentraci 1 mg/ml a zásobní roztok standardu kurkuminu o koncentraci 0,5 mg/ml. K 10 ml zásobního roztoku bylo přidáno 10 ml 2M HCl. Takto připravená reakční směs byla následně vystavena simulovanému procesu trávení při 37 °C po dobu 4 hodin. Po jeho ukončení byly vzorky přefiltrovány přes membránový filtr a nastříknuty na kolonu HPLC.

4.3.6 Úprava vzorků pro enkapsulaci

Pro enkapsulaci byly použity extrakty silymarinu a kurkuminu. Množství 10 mg standardu silymarinu a kurkuminu bylo nejdříve rozpuštěno v 1 ml ethanolu, čímž se zvýšila účinnost rozpouštění a následně byl přidán objem 9 ml destilované vody o teplotě 50 °C. Výchozí koncentrace vodných extraktů byla 1 mg/ml. Takto připravené vzorky, které byly enkapsulovány se následně použily pro stanovení stability částic v modelových trávicích šťávách, a v modelových potravinách. Rovněž byly použity pro stanovení stability částic aplikovaných v modelových potravinách při následném trávení.

4.4 Stanovení celkových polyfenolů

Vzorky reagují s Folin - Ciocalteuovým činidlem za vzniku modrého zbarvení, jehož intenzita je úměrná koncentraci polyfenolů ve vzorku. Celkové množství přítomných fenolických sloučenin se stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 750 nm. Jako standard byla použita kyselina gallová.

Do zkumavek byl napipetován 1 ml 10x zředěného Folin - Ciocalteuova činidla, 1 ml destilované vody a 50 µl vzorku. Roztok byl promíchán a ponechán 5 minut stát při laboratorní teplotě. Pak byl do zkumavek přidán 1 ml nasyceného roztoku Na₂CO₃. Roztok byl opět promíchán a ponechán stát 15 minut při laboratorní teplotě. Po 15 minutách byla měřena absorbance roztoku při $\lambda = 750$ nm oproti blanku, jehož příprava byla totožná, ale místo vzorku bylo do zkumavky přidáno 50 µl destilované vody.

Vyhodnocení: Pro výpočet obsahu polyfenolů byla použita rovnice získaná z kalibrační křivky kyseliny gallové sestavené v rozmezí 0,1 - 0,5 mg/ml.

Rovnice kalibrační křivky: $y = 1,2256x$

Celkový obsah polyfenolů byl vyjádřen v mg/g analyzovaného vzorku. Každý vzorek byl analyzován 3x, výsledné hodnoty jsou průměrem ze 3 paralelních měření.

4.5 Stanovení celkových flavonoidů

Přítomnost flavonoidů v reakční směsi vyvolá změnu zbarvení, která je úměrná koncentraci flavonoidů ve vzorku, je měřena spektrofotometricky při vlnové délce 510 nm. Jako standard byl použit katechin.

Do zkumavek bylo napipetováno 0,5 ml vzorku; 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5 % roztoku NaNO₂. Roztok byl promíchán a ponechán stát při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Poté bylo do zkumavek přidáno 0,2 ml 10 % roztoku AlCl₃. Roztok byl opět promíchán a ponechán 5 minut stát. K roztoku bylo přidáno 1,5 ml 1M roztoku NaOH a 1 ml destilované vody, roztok byl promíchán a ponechán stát při laboratorní teplotě. Po 15 minutách byla měřena absorbance roztoku při $\lambda = 510$ nm oproti blanku, kterým byla destilovaná voda.

Vyhodnocení: Pro výpočet obsahu celkových flavonoidů v roztoku byla použita rovnice získaná z kalibrační křivky katechinu sestavené v rozmezí koncentrací 0,05 - 0,3 mg/ml.

Rovnice kalibrační křivky: $y = 3,5402x$

Celkový obsah flavonoidů byl vyjádřen v mg/g analyzovaného vzorku. Každý vzorek byl analyzován 3x, výsledné hodnoty jsou průměrem ze 3 paralelních měření.

4.6 Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

ABTS s peroxodisíranem draselným tvoří tmavě zelené zbarvení radikálového kationtu $ABTS^{*+}$. Antioxidanty přítomné ve vzorku potlačují intenzitu zbarvení do té míry, která je úměrná jejich celkové koncentraci. Principem je tedy sledování intenzity zbarvení a jeho úbytek v čase. Čím větší pokles absorbance v čase nastane, tím více je v měřeném vzorku antioxidantů.

ABTS bylo rozpuštěno v destilované vodě na koncentraci 7mM. Radikálový kation $ABTS^{*+}$ byl získán reakcí s 2,45 mM peroxodisíranem draselným. Roztok byl ponechán ve tmě při laboratorní teplotě po dobu nejméně 12 hodin. Před použitím byl $ABTS^{*+}$ zředěn UV-VIS ethanolem na absorbanci $0,7 \pm 0,02$ při vlnové délce 734 nm. Jako blank byl použit UV-VIS ethanol.

Do zúžené kyvety byl napipetován 1 ml $ABTS^{*+}$ činidla a bylo přidáno 10 μ l vzorku, směs $ABTS^{*+}$ a vzorku byla promíchána a následně byla změřena počáteční absorbance. Po 10 minutách byla opět změřena absorbance (A_{10}) a sledoval se její pokles. Hodnota, od které se pokles absorbance odečítal, je hodnota substrátu: k 1 ml $ABTS^{*+}$ bylo přidáno 10 μ l destilované vody ($A_0 = 0,697$). Kalibrační křivka byla sestavena pro standardní roztok Troloxu, který byl rozpuštěn v 60 % ethanolu. Rozmezí koncentrací bylo 50 - 400 μ g/ml.

Do rovnice byla dosazována hodnota $\Delta A = A_0 - A_{10}$. Hodnota antioxidační aktivity byla vyjádřena jako ekvivalent Troloxu.

Rovnice kalibrační křivky (koncentrace μ g/ml): $y = 0,0012x$

4.7 Stanovení kyseliny askorbové pomocí HPLC

Jako mobilní fáze byl použit roztok 0,05M octanu sodného a acetonitrilu v poměru 95:5. Eluce byla izokratická, kolona byla v termostatu zahřívána na 30 °C, průtok byl nastaven na 0,6 ml/minutu. Byla použita kolona Supecosil™ LC - NH₂ (4,6 x 150 mm). Na začátek kolony byl do dávkovací smyčky o objemu 20 μ l nastříknut vzorek a detekce látek probíhala v detektoru při vlnové délce 267 nm. Vzorky byly před analýzou filtrovány na membránových filtrech o porozitě 0,45 μ m.

Vyhodnocení: Z chromatogramů byly zjištěny plochy píků a porovnány s naměřenou kalibrační křivkou standardu kyseliny askorbové. Z kalibrační křivky byl poté vypočítán obsah kyseliny askorbové ve vzorku.

Rovnice kalibrační křivky (koncentrace v mg/l): $y = 273,35x$

4.8 Stanovení tokoferolu pomocí HPLC

Jako mobilní fáze byl použit methanol. Kolona byla v termostatu zahřívána na 30 °C, průtok byl nastaven na 1 ml/minutu. Byla použita kolona Kinetex 5u C18 (4,6 x 150 mm). Na začátek kolony byl do dávkovací smyčky o objemu 20 µl nastříknut vzorek a detekce látek probíhala v detektoru při vlnové délce 295 nm. Vzorky byly před analýzou filtrovány na membránových filtrech o porozitě 0,45 µm.

Vyhodnocení: Z chromatogramů byly zjištěny plochy píků a porovnány s naměřenou kalibrační křivkou standardu α-tokoferolu. Z kalibrační křivky byl poté vypočítán obsah tokoferolu ve vzorku.

Rovnice kalibrační křivky (koncentrace v µg/ml): $y = 24222x$

4.9 Stanovení účinné látky pomocí HPLC

Jako mobilní fáze byl použit roztok acetonitrilu a methanolu v poměru 65:35. Eluce byla izokratická, kolona byla v termostatu zahřívána na 30 °C a průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/minutu. Byla použita kolona Kinetex 5u C18 (4,6 x 150 mm). Na začátek kolony byl do dávkovací smyčky o objemu 20 µl nastříknut vzorek a detekce látek probíhala v detektoru při vlnové délce 288 nm pro silymarin a 420 nm pro kurkumin. Vzorky byly před analýzou filtrovány na membránových filtrech o porozitě 0,45 µm.

Vyhodnocení: Z chromatogramů byly zjištěny plochy píků a porovnány s naměřenou kalibrační křivkou standardu - silymarinu a kurkuminu. Z kalibrační křivky byl poté vypočítán obsah účinné látky ve vzorku.

Rovnice kalibračních křivek (koncentrace v µg/ml): silymarin $y = 9500,7x$

kurkumin $y = 491202x$

4.10 Kyselá hydrolýza účinné látky

Kyselou hydrolýzou byl simulován proces trávení, při němž byla sledována degradace účinné látky silymarinu a kurkuminu.

Množství 10 ml zásobního roztoku silymarinu bylo smícháno s 10 ml 2M HCl. Takto připravená reakční směs byla následně zahřívána v lázni o teplotě 37 °C po dobu 4 hodin. Po ukončení inkubace byl roztok zneutralizován na hodnotu pH 7 pomocí 2M NaOH. Stejným postupem byl připraven vzorek pro účinnou látku kurkumin. Následně byla změřena koncentrace účinné látky standardu pomocí HPLC za podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 4.9.

4.11 Příprava částic pomocí ultrazvuku

Účinná látka standardu byla rozpuštěna v 1 ml ethanolu a následně byl roztok doplněn o 9 ml destilované vody na výsledný objem 10 ml. 180 mg sójového lecithinu a 20 mg cholesterolu

bylo rozpuštěno v 10 ml extraktu účinné látky standardu. Liposomy byly vytvořeny sonifikací roztoku standardu, lecithinu a cholesterolu při účinnosti 90 % po dobu 1 minuty.

4.12 Stanovení enkapsulační účinnosti částic

Připravené liposomy byly centrifugovány po dobu 5 minut při 14 800 ot./minutu. Poté byl supernatant slit, přefiltrován přes membránový filtr o porozitě 0,45 µm. V supernatantu byla stanovena koncentrace volné účinné látky standardu. Enkapsulační účinnost byla určena z rozdílu celkové koncentrace účinné látky standardu obsažené v roztoku před a po enkapsulaci.

Výpočet enkapsulační účinnosti:

$$EU\% = \frac{\text{aktivní látka celkové množství} - \text{aktivní látka volné množství}}{\text{aktivní látka celkové množství}} \cdot 100$$

4.13 Stanovení stability částic v trávicích šťávách

Pro simulaci fyziologického prostředí ke sledování stability částic v gastrointestinálním traktu byly připraveny modelové trávicí šťávy - žaludeční šťávy, pankreatické šťávy a směs pankreatické a žlučové šťávy (připravené v poměru 1:1). Připravené částice byly přidány k roztoku žaludeční šťávy v poměru 1:1. Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 20 minut. Následně byl z roztoku žaludeční šťávy odebrán určitý podíl a byl přidán v poměru 1:1 do roztoku pankreatické šťávy a v poměru 1:1 do roztoku směsi pankreatické a žlučové šťávy. Simuloval se přechod potravy ze žaludku do tenkého střeva. Inkubace v těchto šťávách probíhala při 37 °C po dobu 40 minut. Po ukončení inkubace byla pomocí HPLC změřena koncentrace účinné látky standardu uvolněné z částic působením trávicích šťáv. Vzorky byly před analýzou centrifugovány po dobu 5 minut při 14 800 ot./minutu. Supernatant byl filtrován na membránových filtrech o porozitě 0,45 µm. Následně v něm byla změřena koncentrace účinné látky.

4.13.1 Příprava žaludeční šťávy

Pro přípravu modelové žaludeční šťávy bylo použito 0,25 g pepsinu, který byl rozpuštěn ve 100 ml vody. K takto připravenému roztoku bylo přidáno 0,84 ml 35 % kyseliny chlorovodíkové. Hodnota pH modelového roztoku byla upravena na 0,9.

4.13.2 Příprava pankreatické šťávy

Pro přípravu modelové pankreatické šťávy bylo použito 0,25 g pankreatinu a 1,5 g hydrogenuhličitanu sodného, toto množství bylo rozpuštěno ve 100 ml vody. Hodnota pH modelového roztoku byla upravena na 8,9.

4.13.3 Příprava žlučové šťávy

Pro přípravu modelové žlučové šťávy bylo použito 0,8 g žlučových solí, které byly rozpuštěny v 200 ml fosfátového pufru.

4.14 Stanovení stability částic v modelových potravinách

Ke zjištění stability částic v potravinách byly připraveny 4 modelové roztoky o přesně definovaném složení zastupující každou skupinu potravin. Pro potraviny, které mají pH nižší než 4,5 byl připraven 3 % roztok kyseliny octové. Pro potraviny, které mají pH vyšší než 4,5 byla použita destilovaná voda. Pro alkoholické nápoje a potraviny byl připraven 10% roztok ethanolu. Jako modelový roztok pro tukové potraviny byla připravena 25 % emulze oleje ve vodě.

Vzorek byl vždy připraven v poměru 1:3 (částice : modelová potravina). Částice byly v těchto 4 modelových potravinách uchovány při teplotě 5 °C po dobu 1 týdne. Následně byla změřena koncentrace uvolněných účinných látek do roztoku.

4.15 Stanovení stability částic v modelových potravinách v trávicích šťávách

Liposomové částice s enkapsulovanou účinnou látkou silymarinu a kurkuminu byly aplikovány do modelové potraviny a následně byly podrobeny analýze jejich stability v modelovém fyziologickém prostředí při procesu trávení. Částice byly v modelové potravině inkubovány při teplotě 5 °C a skladovány po dobu 7 dní. Po ukončení inkubace byly modelové potraviny s obsahem částic aplikovány do modelových trávicích šťáv.

Vzorek pro analýzu byl připraven v poměru 1:1 (částice v modelové potravině : trávicí šťáva). Inkubace částic obsažených v modelové potravině aplikované do žaludeční šťávy probíhala při 37 °C po dobu 20 minut. Následně byl z roztoku žaludeční šťávy odebrán určitý podíl a byl přidán v poměru 1:1 do roztoku pankreatické šťávy a v poměru 1:1 do roztoku směsi pankreatické a žlučové šťávy. Simuloval se přechod potravy ze žaludku do tenkého střeva. Inkubace v těchto šťávách probíhala při 37 °C po dobu 40 minut. Po ukončení inkubace byla pomocí HPLC změřena koncentrace účinné látky standardu uvolněné z částic obsažených v modelové potravině působením trávicích šťáv. Vzorky byly před analýzou centrifugovány po dobu 5 minut při 14 800 ot./minutu. Supernatant byl filtrován na membránových filtrech o porozitě 0,45 µm. Následně v něm byla změřena koncentrace účinné látky.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je zaměřena na studium účinnosti aktivních látek přírodních extraktů ostropestřce mariánského a kurkumovníku dlouhého. Přírodní extrakty byly nejprve charakterizovány pomocí následujících skupinových charakteristik: stanovení celkových polyfenolů, stanovení celkových flavonoidů, stanovení antioxidační aktivity, stanovení obsahu vitamínu C a tokoferolu. Následně byly připraveny liposomové částice s obsahem účinné látky silymarinu a kurkuminu. V rámci analýzy bylo sledováno chování částic během inkubace v prostředí modelových trávicích šťáv a také stabilita při uchování částic v modelových potravinách.

5.1 Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení celkových polyfenolů bylo provedeno pomocí reakce s Folin – Ciocalteuovým činidlem. Jako standard byla použita kyselina gallová. Postup stanovení je uveden v kapitole 4.4. Naměřené hodnoty jednotlivých vzorků jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka č. 1 Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení celkových polyfenolů						
		Absorbance			Ø absorbance ± SD	c [mg · g ⁻¹]
kurkuma	oddenek čerstvý	0,694	0,707	0,660	0,687 ± 0,024	56,054
	Koření	0,254	0,268	0,272	0,265 ± 0,009	21,622
	nanokurkumin	0,126	0,149	0,132	0,136 ± 0,012	11,096
ostropestřec	plody výluh	0,011	0,014	0,010	0,012 ± 0,002	0,098
	plody extrakt	0,082	0,109	0,082	0,091 ± 0,016	0,742
	Olej	0,079	0,129	0,070	0,093 ± 0,032	7,588
	Tinktura	0,041	0,037	0,038	0,039 ± 0,002	3,182
	Kapsle *	0,159	0,168	0,160	0,162 ± 0,005	132,180

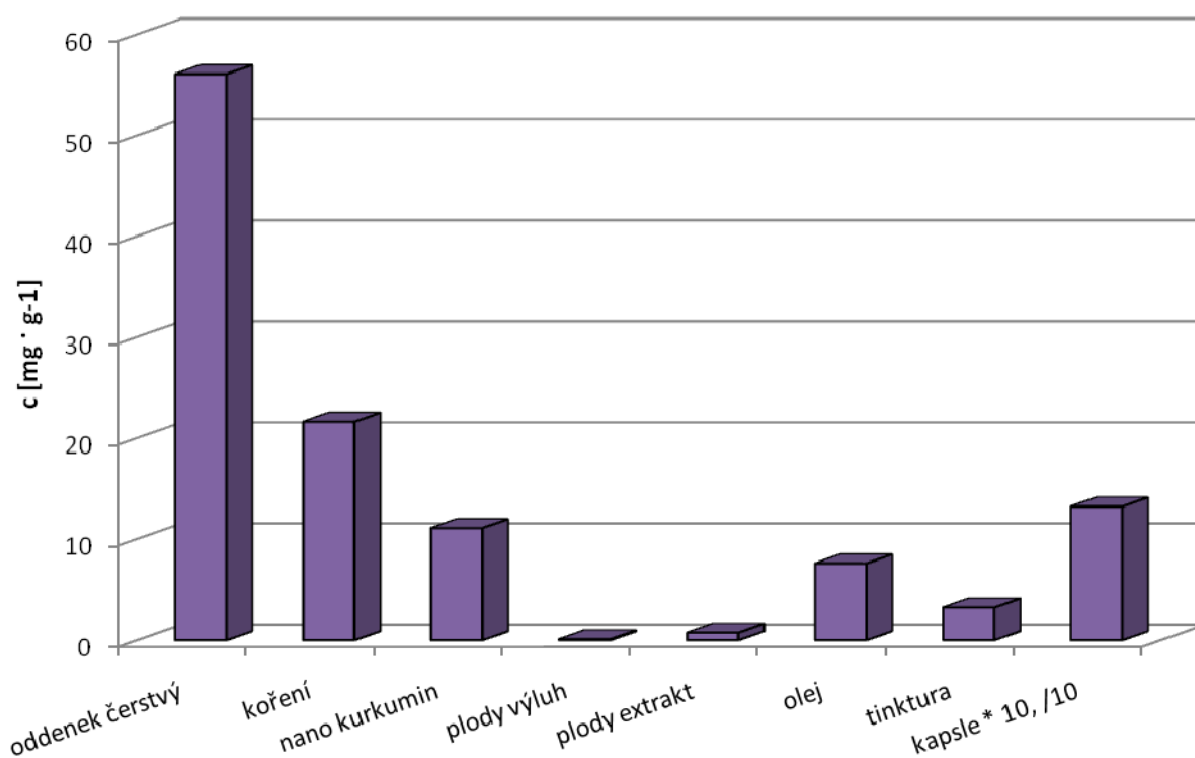
* označuje ředění vzorku 10x

Každý vzorek byl analyzován 3x, výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří paralelních stanovení. Průměr hodnot se následně dosazoval do rovnice kalibrační křivky kyseliny gallové pro zjištění obsahu polyfenolů ve vzorcích.

Pro srovnání jednotlivých přírodních extraktů byly výše uvedené hodnoty vztaženy na 1 g analyzovaného vzorku.

Nejvyšší obsah polyfenolů byl zaznamenán v ostropestřcových kapslích 132,18 mg/g a v oddenku kurkumy 56,05 mg/g. Naopak nejnižší obsah polyfenolů byl naměřen ve výluhu plodu ostropestřce 0,098 mg/g a v extraktu plodu ostropestřce 0,742 mg/g.

Z hodnot udávajících množství polyfenolů obsažených ve výluhu a extraktu z plodu ostropestřce je možné vidět rozdíl. V alkoholovém extraktu se rozpouští více účinných látek, hlavně lipidického charakteru, než ve vodném výluhu.



Graf č. 1 Stanovení obsahu polyfenolů ve vybraných vzorcích

5.2 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkových flavonoidů bylo provedeno pomocí reakce s hlinitou solí v zásaditém prostředí. Jako standard byl použit katechin. Postup stanovení je uveden v kapitole 4.5. Naměřené hodnoty v jednotlivých vzorcích jsou shrnuty v následující tabulce.

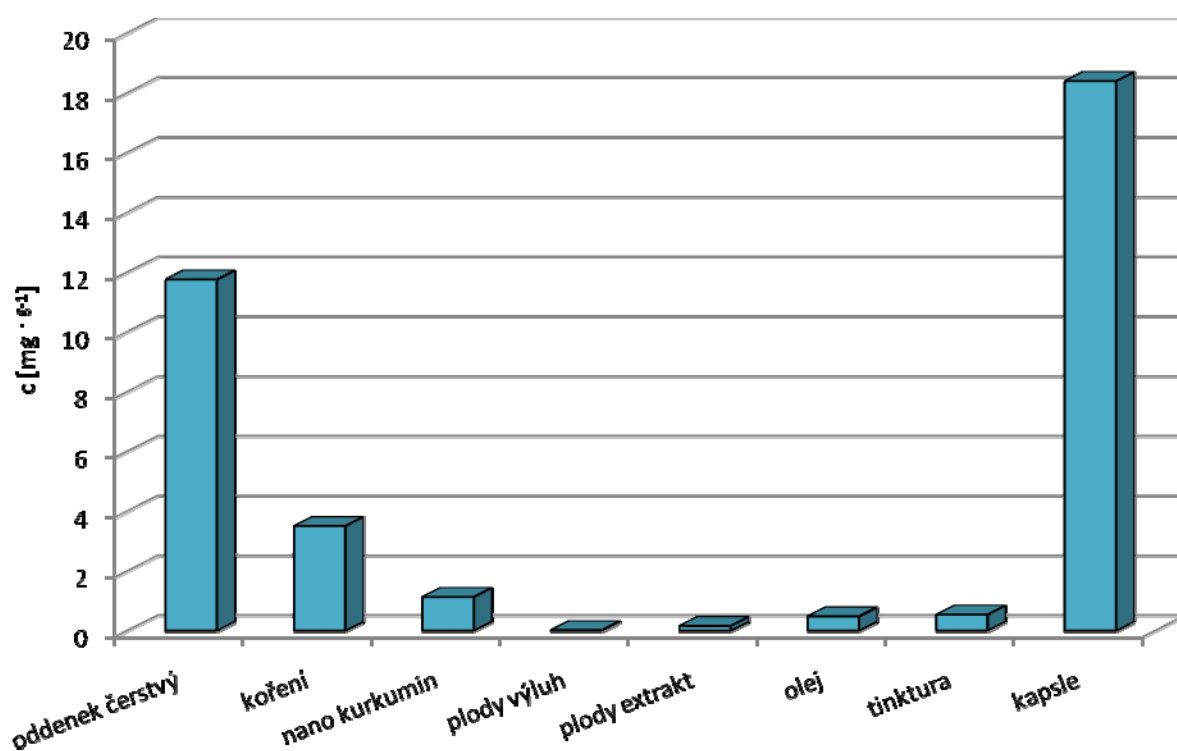
Tabulka č. 2 Stanovení celkových flavonoidů

Stanovení celkových flavonoidů						
		Absorbance			Ø absorbance ± SD	c [mg · g ⁻¹]
kurkuma	oddenek čerstvý	0,400	0,443	0,405	0,416 ± 0,024	11,751
	Koření	0,112	0,134	0,126	0,124 ± 0,011	3,503
	nano kurkumin	0,031	0,056	0,034	0,040 ± 0,014	1,130
ostropestřec	plody výluh	0,013	0,004	0,002	0,006 ± 0,006	0,017
	plody extrakt	0,057	0,056	0,058	0,057 ± 0,001	0,161
	Olej	0,020	0,016	0,014	0,017 ± 0,003	0,480
	Tinktura	0,019	0,020	0,018	0,019 ± 0,001	0,537
	Kapsle	0,628	0,663	0,662	0,651 ± 0,020	18,389

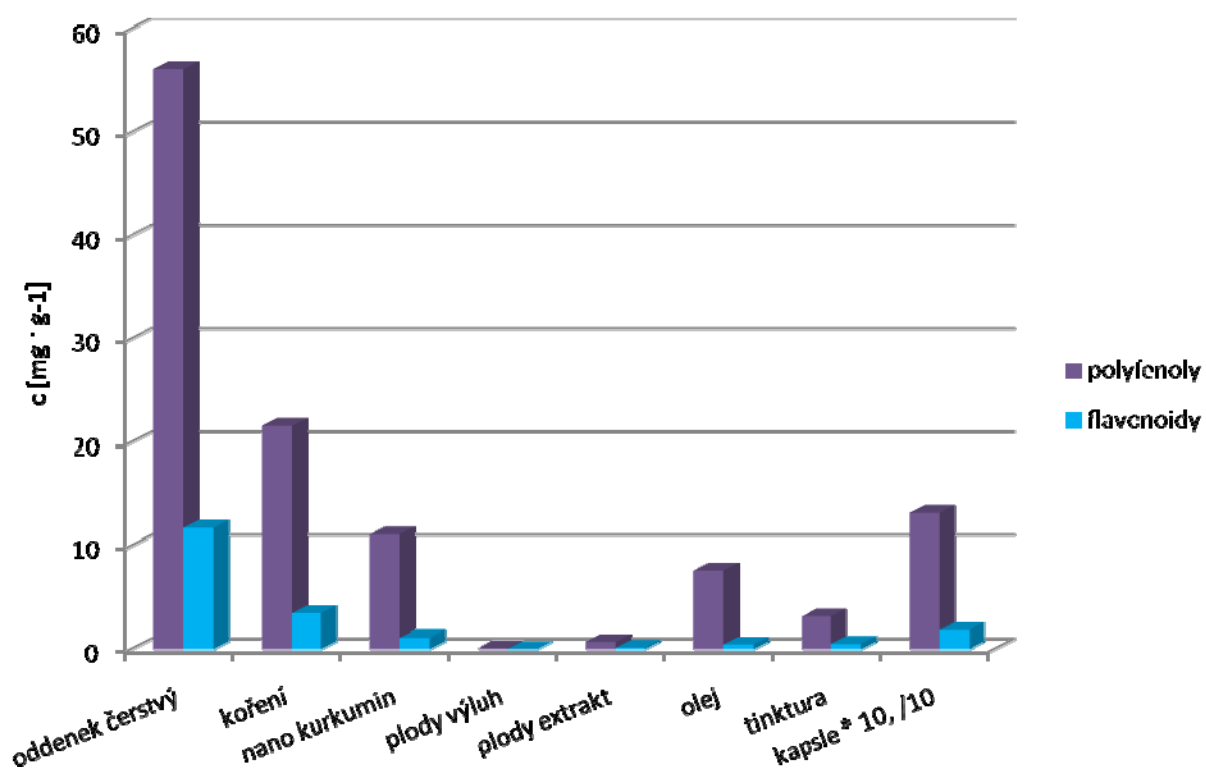
Každý vzorek byl analyzován 3x, výsledné hodnoty jsou průměrem ze tří paralelních stanovení. Průměr hodnot se následně dosazoval do rovnice kalibrační křivky katechinu pro zjištění obsahu flavonoidů ve vzorcích. Pro srovnání jednotlivých přírodních extraktů byly výše uvedené hodnoty vztaženy na 1 g analyzovaného vzorku.

Flavonoidy jsou podskupinou polyfenolů. Nejvyšší obsah flavonoidních látek byl naměřen v ostropestřcových kapslích 18,389 mg/g, vysoká hodnota byla zaznamenána také u oddenku kurkumy 11,751 mg/g. Naopak nejnižší obsah flavonoidních látek byl naměřen ve výluhu plodu ostropestřce 0,017 mg/g a v extraktu plodu ostropestřce 0,161 mg/g.

Graf č. 3 znázorňuje obsah flavonoidních látek v polyfenolech. Výrazný podíl flavonoidů je možné vidět v oddenku kurkumy, který odpovídá přibližně 1/5 obsahu polyfenolů. U ostatních vzorků je jejich podíl výrazně nižší.



Graf č. 2 Stanovení obsahu flavonoidů ve vybraných vzorcích



Graf č. 3 Zobrazení podílu flavonoidů v polyfenolech

5.3 Stanovení antioxidační aktivity

Míra antioxidační aktivity byla zjištěna pomocí metody TEAC – „Trolox Equivalent Antioxidant Capacity“. Samotná aktivita se potom přirovnává k množství standardu Troloxu, který má ekvivalentní antioxidační aktivitu jako samotný vzorek. Postup stanovení je uveden v kapitole 4.6. Naměřené hodnoty v jednotlivých vzorcích jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka č. 3 Stanovení antioxidační aktivity

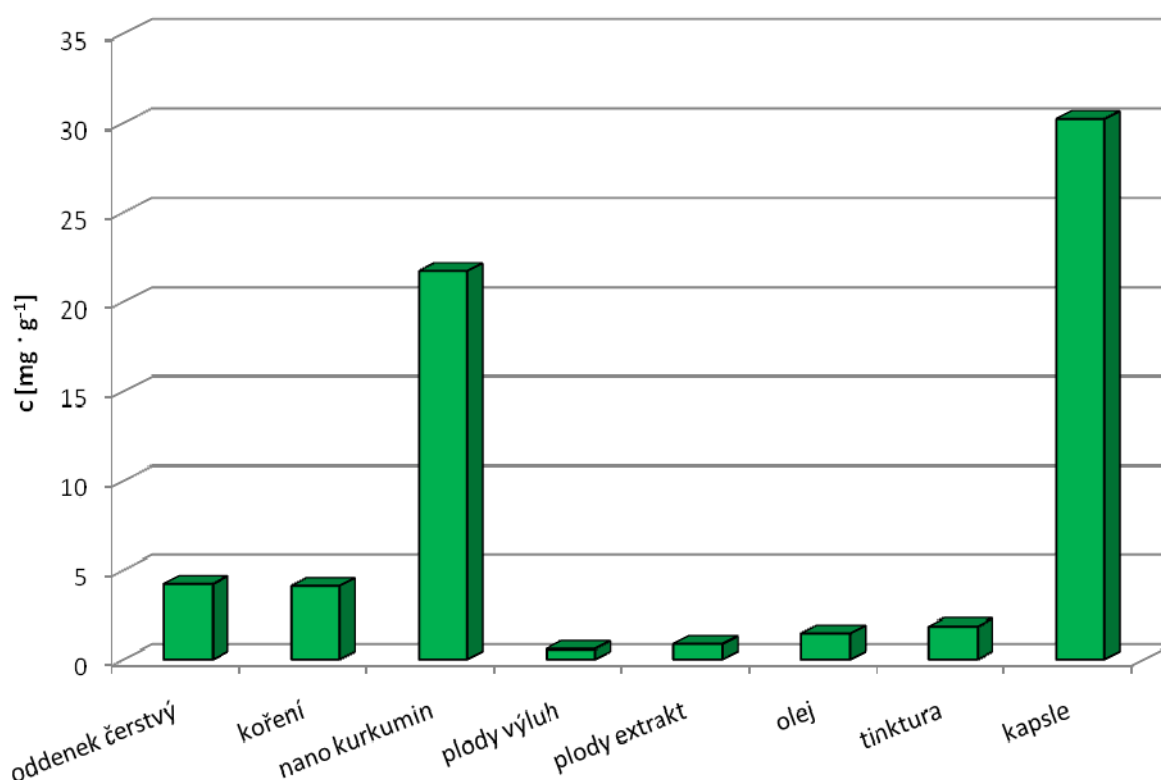
Stanovení antioxidační aktivity						
		Absorbance (A_{10})			$\bar{\Delta A} \pm SD$	$c [mg \cdot g^{-1}]$
kurkuma	oddenek čerstvý	0,668	0,643	0,629	$0,050 \pm 0,020$	4,192
	Koření	0,645	0,651	0,648	$0,049 \pm 0,003$	4,083
	nanokurkumin	0,479	0,410	0,420	$0,261 \pm 0,037$	21,717
ostropestřec	plody výluh	0,619	0,609	0,635	$0,068 \pm 0,013$	0,567
	plody extrakt	0,613	0,567	0,583	$0,101 \pm 0,023$	0,844
	Olej	0,684	0,682	0,673	$0,017 \pm 0,006$	1,442
	Tinktura	0,675	0,677	0,673	$0,022 \pm 0,002$	1,833
	Kapsle	0,340	0,321	0,342	$0,363 \pm 0,012$	30,217

Každý vzorek byl analyzován 3x, z hodnot absorbance v čase 10 min. byl zjištěn pokles absorbance (A_0 - A_{10}). Průměrná hodnota poklesu absorbance se následně dosazovala do rovnice kalibrační křivky standardu Troloxu pro zjištění antioxidační aktivity.

Vzorec pro výpočet poklesu absorbance $\Delta A = A_0 - A_{10}$, kde $A_0 = 0,697$. Hodnota antioxidační aktivity byla vyjádřena jako ekvivalent Troloxu. Pro srovnání jednotlivých přírodních extraktů byly výše uvedené hodnoty vztaženy na 1 g analyzovaného vzorku.

Výrazně nejvyšší hladina celkové antioxidační aktivity byla zjištěna v kapslích ostropestřce a ve vzorku nanokurkuminu. Jejich antioxidační aktivita byla několikanásobně vyšší, než zjištěná antioxidační aktivita ostatních vzorků což můžeme vidět v grafu č. 4.

Nanokurkumin obsahuje standardizovaný extrakt kurkuminu, který zajišťuje jeho výraznou antioxidační aktivitu. Díky tomu, že je nanokurkumin balený do částic, nedochází ke ztrátě jeho antioxidační aktivity. Vysoká antioxidační aktivita ostropestřcových kapslí je pravděpodobně dána tím, že obsahuje koncentrovaný extrakt silymarinu, který je tvořen směsí flavonoidů a přírodních flavonolignanů, které se v antioxidačním účinku doplňují.



Graf č. 4 Hodnoty stanovení celkové antioxidační aktivity

5.4 Stanovení kyseliny askorbové pomocí HPLC

Obsah kyseliny askorbové v jednotlivých vzorcích byl sledován pomocí HPLC. Jako standard byla použita kyselina askorbová. Postup stanovení je uveden v kapitole 4.7. Naměřené hodnoty v jednotlivých vzorcích jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka č. 4 Hodnoty stanovení kyseliny askorbové

analyzovaný vzorek	kyselina askorbová
ostropestřec plod	30,930 µg/g
ostropestřec tinktura	13,786 mg/l
ostropestřec olej	0,320 mg/l
kurkuma oddenek	X

Nejvyšší množství kyseliny askorbové bylo detekováno v ostropestřcové tinktuře 13,786 mg/l. Naopak v oddenku kurkumy nebyla kyselina askorbová detekována vůbec. V plodech ostropestřce bylo detekováno 30,930 $\mu\text{g/g}$ kyseliny askorbové. V oleji ostropestřce bylo zjištěno stopové množství kyseliny askorbové.

Výrobce tinktury deklaroval, že byl vitamin C do tinktury přidáván. Může to být z důvodu lepší vstřebatelnosti a biologické účinnosti produktu, nebo pravděpodobně jako konzervant daného výrobku.

5.5 Stanovení tokoferolu pomocí HPLC

Obsah tokoferolu v jednotlivých vzorcích byl stanoven pomocí HPLC. Jako standard byl použit α -tokoferol. Postup stanovení je uveden v kapitole 4.8. Naměřené hodnoty v jednotlivých vzorcích jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka č. 5 Hodnoty stanovení tokoferolu

analyzovaný vzorek	c [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]
ostropestřec plod	17,138
kurkuma oddenek	6,600
kurkuma koření	7,356
Nanokurkumin	1,404

Pro srovnání jednotlivých přírodních extraktů byly výše uvedené hodnoty vztaženy na 1 g analyzovaného vzorku.

Největší množství tokoferolu bylo stanoveno v plodech ostropestřce 17,138 $\mu\text{g/g}$. Naopak nejnižší množství bylo zjištěno ve vzorku nanokurkuminu 1,404 $\mu\text{g/g}$.

5.6 Stanovení účinné látky pomocí HPLC

Množství účinné látky silymarinu bylo sledováno v plodech ostropestřce a množství kurkuminu bylo sledováno v oddenku kurkumy. Obsah účinné látky byl stanoven podle postupu uvedeného v kapitole 4.9. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka č. 6 Hodnoty obsahu účinné látky ostropestřce a kurkumy

účinná látka	obsah účinné látky [%]
Silymarin	2,7
Kurkumin	3,7

Literatura uvádí, že se obsah kurkuminu v oddenku kurkumy vyskytuje v množství cca 2-3 % a obsah silymarinu v plodech ostropestřce se pohybuje v rozmezí 1,5–3 %. Naším stanovením byl tento údaj potvrzen.

5.7 Kyselá hydrolýza účinné látky

Při simulaci procesu trávení kyselou hydrolýzou byla sledována degradace účinné látky silymarinu a kurkuminu. Postup stanovení je uveden v kapitole 4.10. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka č. 7 Degradace účinné látky silymarinu a kurkuminu

účinná látka	ztráta účinné látky [%]
Silymarin	46,56
Kurkumin	42,00

Vlivem teploty a kyselého prostředí došlo k degradaci účinné látky. U kurkuminu byla ztráta účinné látky kyselou hydrolýzou ve výši 42 %. Nepatrně vyšší ztráta byla zaznamenána u účinné látky silymarinu, a to ztráta 46,56 % během procesu kyselé hydrolýzy.

Z toho vyplývá, že je potřeba účinnou látku chránit během jejího průchodu gastrointestinálním traktem, aby nedocházelo k její degradaci. Jednou z možností je cílená ochrana účinné látky enkapsulací, čímž dojde k zachování její stability v kyselém prostředí žaludku a dojde ke zvýšení biologické dostupnosti. Účinná látka je dopravena na „místo určení“ tedy do prostředí střevních šťáv, kde je následně resorbována.

5.8 Stanovení enkapsulační účinnosti částic

K enkapsulaci byly použity účinné látky standardu silymarinu a kurkuminu. Připravené liposomy byly centrifugovány při 14 800 ot./minutu, supernatant byl slit a byla v něm stanovena pomocí HPLC koncentrace zbylé volné účinné látky. Pro určení míry enkapsulace byla nejdříve zjištěna koncentrace účinné látky v extraktu standardu. Z těchto dvou hodnot byla poté vypočítána enkapsulační účinnost podle vzorce, který je uveden v kapitole 4.12. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka č. 8 Enkapsulační účinnost účinné látky

účinná látka	enkapsulované množství [%]
Silymarin	59,45
Kurkumin	90,34

Při přípravě liposomů byl použit roztok účinné látky standardu o koncentraci 100 µg/ml. V takto koncentrovaném roztoku s obsahem účinné látky kurkuminu bylo dosaženo 90,34 % enkapsulační účinnosti. V roztoku účinné látky silymarinu bylo dosaženo 59,45 % účinnosti enkapsulace.

5.9 Stanovení stability částic v trávicích šťávách

Připravené částice s obsahem účinné látky standardu silymarinu a kurkuminu byly aplikovány do modelových trávicích šťáv, kde bylo sledováno uvolněné množství enkapsulovaných účinných látek. Je potřeba zajistit ochranu a stabilitu účinné látky při průchodu GIT, aby byla zachována její aktivita a nedocházelo k její degradaci v prostředí žaludeční šťávy a mohla tak být dopravena na místo, kde dochází k její resorpci, tedy v prostředí střevních šťáv. Příprava modelových trávicích šťáv a postup stanovení je uveden v kapitole 4.13. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v následujících tabulkách.

Tabulka č. 9 Stabilita částic v trávicích šťávách

účinná látka kurkumin	množství uvolněných liposomů [%]
částice supernatant	9,66
žaludeční šťáva	1,26
pankreatická šťáva	2,24
pankreatická a žlučová šťáva	2,83

Tabulka č. 10 Stabilita částic v trávicích šťávách

účinná látka silymarin	množství uvolněných liposomů [%]
částice supernatant	40,55
žaludeční šťáva	31,69
pankreatická šťáva	18,30
pankreatická a žlučová šťáva	17,79

Z naměřených hodnot vyplývá, že liposomy s obsahem kurkuminu vykazují velmi vysokou stabilitu. Vlivem kyselého prostředí žaludeční šťávy se uvolnilo jen minimální množství účinné látky z liposomů. Množství uvolněné účinné látky se při simulaci průchodu gastrointestinálním traktem pohybovalo okolo 2 %. Naměřené hodnoty účinné látky silymarinu naznačují, že stabilita liposomů v modelové žaludeční šťávě není tak vysoká jako v případě kurkuminu. Vlivem kyselého prostředí žaludeční šťávy se uvolnilo téměř 32 % liposomů. Množství uvolněných liposomů v pankreatické šťávě a směsi pankreatické a žlučové šťávy se pohybovalo okolo 18 %.

Z těchto výsledků vyplývá, že enkapsulaci lze využít k cílenému transportu účinné látky trávicím traktem. Při průchodu žaludkem je zachována stabilita částic a k řízenému uvolňování účinné látky pak dojde v prostředí střev.

5.10 Stanovení stability částic v modelových potravinách

U částic s enkapsulovanou účinnou látkou silymarinu a kurkuminu byla sledována stabilita v modelových potravinách po uplynutí doby jednoho týdne. Stabilita byla stanovena pomocí HPLC. Složení jednotlivých modelových systémů a postup stanovení je uveden v kapitole 4.14. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v následujících tabulkách.

Tabulka č. 11 Stabilita kurkuminu v modelových potravinách

modelová potravina	množství stabilních částic [%]
Kyselá	71,30
Neutrální	62,32
Alkoholická	77,08
Tuková	97,12

Tabulka č. 12 Stabilita silymarinu v modelových potravinách

modelová potravina	množství stabilních částic [%]
Kyselá	34,31
Neutrální	38,84
Alkoholická	38,28
Tuková	47,55

V závislosti na druhu modelové potraviny je možné říci, že nejvyšší stabilitu vykazovaly částice s obsahem účinné látky v modelové tukové potravine. Emulze oleje zvyšuje stabilitu liposomů, příčinou může být stabilizace interakce s lipidy. Obecně se ale stabilita částic v závislosti na modelových potravinách příliš nelišila. Avšak v porovnání množství stabilních částic s obsahem účinné látky silymarinu bylo o polovinu nižší než množství částic s obsahem kurkuminu. Tento poměr je dán i tím, že při enkapsulaci kurkuminu bylo zabaleno 90,34 % účinné látky, v případě silymarinu to bylo 59,45 %.

5.10.1 Stanovení stability částic v modelových potravinách při následném trávení

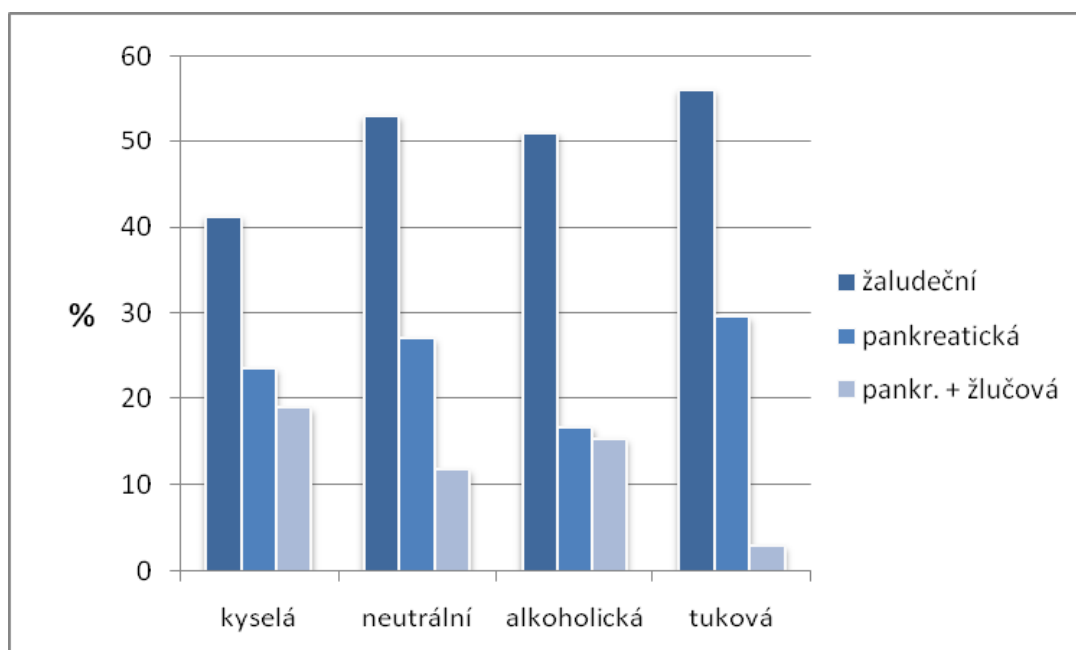
Po uplynutí inkubační doby jednoho týdne, kdy byly modelové potraviny skladovány při teplotě 5 °C, došlo k jejich aplikování do modelových trávicích šťáv. Bylo sledováno množství uvolněné účinné látky z modelové potraviny během procesu trávení. Postup stanovení je uveden v kapitole 4.15. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka č. 13 Stabilita částic obsažených v modelových potravinách s následným trávením

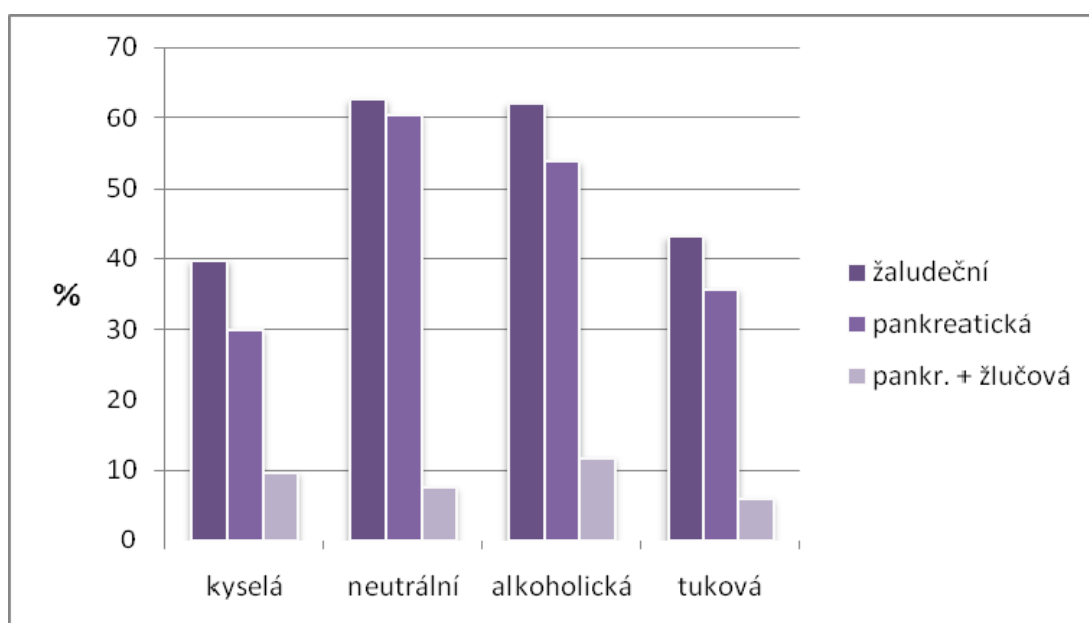
modelová potravina	množství uvolněných liposomů [%]		
	Šťáva		
	žaludeční	pankreatická	pankr. + žlučová
Silymarin			
Kyselá	41,19	23,56	18,85
Neutrální	52,95	27,06	11,72
Alkoholická	50,88	16,57	15,26
Tuková	55,97	29,52	2,88
Kurkumin			
Kyselá	39,63	29,93	9,62
Neutrální	62,51	60,47	7,41
Alkoholická	61,97	53,81	11,56
Tuková	43,09	35,56	5,85

Z tabulky je zřejmé, že při postupu modelové potraviny gastrointestinálním traktem dochází k postupnému uvolňování účinné látky z liposomů. Množství uvolněných liposomů klesá v pořadí: žaludeční šťáva > pankreatická šťáva > směs pankreatické a žlučové šťávy.

Z těchto výsledků vyplývá, že při uchování částic v modelových potravinách je zachována stabilita účinné látky. Dobrá stabilita částic a jejich nízká odolnost v prostředí střeva je dobrým základem pro aplikaci částic do různých potravinářských výrobků či doplňků stravy s pozitivním účinkem na lidský organismus.



Graf č. 5 Množství uvolněných liposomů s obsahem silymarinu z modelových potravin v prostředí trávicích šťáv



Graf č. 6 Množství uvolněných liposomů s obsahem kurkuminu z modelových potravin v prostředí trávicích šťáv

6 ZÁVĚR

Ostropestřec mariánský a kurkuma jsou rostliny obsahující řadu biologicky aktivních látek, které působí na životní funkce organismu. Hlavními nositeli léčivého účinku rostliny ostropestřce jsou polyfenoly, flavonoidy, glykosidy a flavonolignany, které tvoří aktivní komplex lipofilního extraktu silymarinu. Kurkuma obsahuje účinné látky kurkuminoidy, kde je nositelem léčivého účinku kurkumin. Díky obsahu biologicky aktivních látek vykazuje extrakt silymarinu a kurkuminu vysokou antioxidační aktivitu, které je dnes věnována velká pozornost a řada studií. Výzkum je věnován také jejich hepatoprotektivnímu účinku, protizánětlivým, antikancerogenním a antimikrobiálním účinkům.

Cílem diplomové práce bylo stanovit biologicky aktivní látky přírodních extraktů ostropestřce a kurkumy. Sledovala se míra antioxidační aktivity, obsah celkových polyfenolů a flavonoidů, přítomnost vitaminu C a tokoferolu. Účinné látky silymarinu a kurkuminu byly aplikovány do organických částic, liposomů, pro zajištění jejich stability a účinnosti v prostředí GIT.

Obsah celkových polyfenolů byl stanoven spektrofotometricky pomocí reakce Folin-Ciocalteuova činidla s fenoly obsaženými v rostlinných extraktech. Nejvyšší obsah polyfenolů byl zjištěn v kapslích ostropestřce a v oddenku kurkumy. Naopak nejnižší obsah polyfenolů byl zjištěn v extraktu a výluhu plodu ostropestřce. Celkový obsah flavonoidů byl stanoven spektrofotometricky reakcí hlinité soli a dusitanu s flavonoidy obsaženými v rostlinných extraktech. Nejvyšší koncentrace flavonoidů byla stanovena v oddenku kurkumy. Podíl flavonoidů odpovídal přibližně 1/5 obsahu polyfenolů v oddenku kurkumy. V ostatních vzorcích byl podíl flavonoidů výrazně nižší. Míra antioxidační aktivity byla stanovena spektrofotometricky metodou TEAC využívající činidlo ABTS. Testovala se schopnost látek obsažených v rostlinném extraktu zhaset kation-radikál $ABTS^{+•}$. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly kapsle ostropestřce a nanokurkumin, tedy farmakologicky upravené preparáty. Avšak všechny analyzované extrakty vykazovaly antioxidační aktivitu. Obecně lze říci, že je mnohem výhodnější přijímat antioxidanty v přirozené formě, než v syntetické. Nejen proto, že přirozené antioxidanty mají vyšší účinnost díky synergii více látek, ale i proto, že příliš vysoké dávky syntetických antioxidantů mohou způsobovat oxidační stres.

Pomocí HPLC s detektorem diodového pole byl zjišťován obsah kyseliny askorbové a tokoferolu v rostlinných extraktech ostropestřce a kurkumy. V plodech ostropestřce byla stanovena přítomnost kyseliny askorbové i tokoferolu, v oddenku kurkumy byl stanoven pouze tokoferol. Metodou HPLC byl taktéž stanoven obsah účinné látky. Ostropestřec plod obsahoval 2,7 % silymarinu, kurkuma kořen obsahovala 3,7 % kurkuminu.

Během simulace procesu trávení bylo zjištěno, že vlivem kyselého prostředí dochází k degradaci účinné látky silymarinu a kurkuminu. Je tedy nutné chránit účinnou látku během průchodu GIT. Enkapsulací dojde k zachování stability účinné látky v kyselém prostředí žaludku a zvýší se tak její biologická dostupnost. Účinná látka je dopravena do prostředí střevních šťáv, kde je resorbována. Připravené liposomové částice vykazovaly v případě

kurkuminu velmi vysokou enkapsulační účinnost 90,34 %, enkapsulační účinnost silymarinu byla 59,45 %.

V další části byla sledována stabilita částic v GIT. Pro simulaci fyziologického prostředí byly připraveny modelové trávicí šťávy: žaludeční šťáva, pankreatická šťáva, směs pankreatické a žlučové šťávy. Bylo zjištěno, že při průchodu žaludkem zůstává zachována stabilita částic a k uvolňování účinné látky dochází následně v prostředí střev. Enkapsulaci je tedy možné využít k cílenému transportu účinné látky trávicím traktem. Stabilita částic byla sledována v prostředí 4 modelových potravin a to: kyselé, neutrální, alkoholové a tukové potravině. Stabilita částic byla sledována po aplikaci do prostředí modelových potravin při jejich následném trávení. Díky cílenému a pozvolnému uvolňování účinné látky společně s dobrou dlouhodobou stabilitou v prostředí modelových potravin jsou liposomy s obsahem účinné látky silymarinu a kurkuminu vhodné pro aplikaci přímo do potravin nebo do různých potravinových doplňků. Částice lze využít k řízenému uvolňování účinné látky v prostředí střeva, což je výhodné pro zvýšení biologického účinku.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] OPLETAL, L., SKŘIVANOVÁ, V.: *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2010. 653 s. ISBN 978-80-246-1801-2.
- [2] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J.: *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS, 2009. 644 s. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [3] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 1*. Tábor: OSSIS, 1999. 331 s. ISBN 80-902391-3-7.
- [4] BUŘIČOVÁ, L., RÉBLOVÁ, Z.: Czech medicinal plants as possible sources of antioxidants. *Czech J. Food Sci*, 2008, vol. 26, no. 2, pp. 132-138.
- [5] KALAČ, P.: *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*. Vyd. 1. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2001. 120 s. ISBN 80-7040-520-1.
- [6] BENEŠOVÁ, L.: *Potravinářství 6*. 1. vyd. Praha: ÚZPI – ústav zemědělských a potravinářských informací, 2000, 150 s. ISBN 80-727-1003-6.
- [7] RYBKOVÁ, Z., MALACHOVÁ, K.: Využití plasmidu pBluescript pro detekci antioxidační aktivity rostlinných fenolových látek. *Chemické listy*, 2011, roč. 105, s. 129-132.
- [8] GUIMARAES, R., BARROS, L., DUENAS, M., CARVALHO, M. A.: Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*, 2013, 141, pp. 1721-1730.
- [9] MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, CH., RÉMESY, CH., JIMENEZ, L.: Polyphenols: food sources and bioavailability. *Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 79, pp. 727-747.
- [10] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS, 1999. 304 s. ISBN 80-902391-4-5.
- [11] ŠTÍPEK, S. a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Grada, 2000. 314 s. ISBN 80-7169-704-4.
- [12] KHASSAF, M., and comp.: Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle, *Journal of physiology-London* 549 (2) [online].2003,[cit. 2016-04-10]. ISSN 0022-3751.
- [13] HOSMANOVÁ, R., DOUŠA, M.: HPLC stanovení obsahu vitamínu E v krmných surovinách, krmivech a potravinách. *Chemické listy*, 2007, roč. 101, s. 578-583.
- [14] OPLETAL, L.: *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2010. 378 s. ISBN 978-80-246-1884-5.
- [15] MORAZZONI, P., BOMBARDELLI, E.: Silybum marianum (Carduus marianus). *Fitoterapia* 66, 1995, pp. 3–42.
- [16] GRAU, J., JUNG, R., MUNKER, B.: *Bobulovité, užitkové a léčivé rostliny*. Praha: Ikar, 1996. 196 s.

- [17] SOUČKOVÁ, M.: *Hodnocení olejnatosti plodů různých odrůd ostropestřce mariánského*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2011. 64 s.
- [18] KOPECKÁ, Z.: *Hodnocení produkce ostropestřce mariánského*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2012. 77 s.
- [19] PRADHAN, SC., GIRISH, C.: *Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine*. Indian Journal of Medical Research. 2006, vol. 124, pp 491 - 504.
- [20] *WHO Monographs on selected medicinal plants*, [online], 2004, vol. 2, Geneva: World Health Organization, 357 p.
- [21] BŮHRINGOVÁ, U.: *Léčivé rostliny: Obsahové látky, zpracování, základní recepty*. Praha: Knížní klub, 2010, 360 s. ISBN 978-80-242-2474-9.
Dostupné z: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4927e/>
- [22] BRABENEC, M., BŮRIK, J.: *Pestovanie liečivých a koreninových rastlín na malých plochách*. Praha: Svépomoc, 1990, 328 s. ISBN 80-85168-09-X.
- [23] VODRÁŽKA, Z.: *Biochemie*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1993. 191 s. ISBN 80-200-0471-8.
- [24] PETRIE, M., McKAY, G., FISHER, M.: Silymarin. *Practical Diabetes*, 2015, vol. 32, no. 4, pp. 148–150.
- [25] Milk thistle. PDR for Herbal Medicines. 4th edition. Montvale, New Jersey: Thomson Healthcare Inc. 2007, pp. 578-583.
- [26] GAŽÁK, R., WALTEROVÁ, D., KŘEN, V.: Silybin and silymarin – new and emerging applications in medicine. *Current Medicinal Chemistry*, 2007, no. 14, pp. 315–338.
- [27] SINGH, R. P., AGARWAL, R.: Prostate cancer chemoprevention by silibinin: Bench to bedside. *Molecular Carcinogenesis*, 2006, no. 45, pp. 436–442.
- [28] KOHNO, H., TANAKA, T., KAWABATA, K., HIROSE, I., SUGIE, S., TSUDA, H., MORI, H.: Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *International Journal of Cancer*, 2002, no. 101, pp. 461-468.
- [29] BEAR-DUBOWSKA, W., SZAEFER, H., KRAJKA-KURNIAK, V.: Inhibition of mureine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica*, 1998, no. 28, pp. 735–743.
- [30] DŽUBÁK, P., HAJDÚCH, M., GAŽÁK, R., SVOBODOVÁ, A., PSOTOVÁ, J., WALTEROVÁ, D., SEDMERA, P., KŘEN, V.: New derivatives of silybin and 2,3 dehydrosilybin and their cytotoxic and P-glycoprotein modulatory activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2006, no. 14, pp. 3793–3810.
- [31] TŮMOVÁ, L., GALLOVÁ, K.: Terapeutické účinky Silybum marianum. *Praktické lékařství*. 2006, roč. 4, s. 185-187.

- [32] AFAQ, F., ADHAMI, V. M., AHMAD, N., MUKHTAR, H.: Botanical antioxidants for chemoprevention of photocarcinogenesis. *Frontiers in Bioscience*, 2002, no. 7, pp. 784-792.
- [33] KATIYAR, S. K.: Silymarin and skin cancer prevention: anti-inflammatory, antioxidant and immunomodulatory effects. *International Journal of Oncology*, 2005, no. 26, pp. 169-176.
- [34] NAIR, K.: *The agronomy and economy of turmeric and ginger: The invaluable medicinal spice corps*. Burlington: Elsevier Science, 2013. ISBN 9780123948014.
- [35] SHOBA, G. et al.: Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers. *Planta Medica*. 1998, vol. 64, no. 4, pp. 353-356.
- [36] EJAZ, A., WU, D., KWAN, P., MEYDANI, M.: Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *Journal of Nutrition*. 2009, vol. 139, no. 5, pp. 919-925.
- [37] AHMED, T. et al.: Ameliorating effect of N-acetylcysteine and curcumin on pesticide-induced oxidative DNA damage in human peripheral blood mononuclear cells. *Environmental Monitoring Assessment*. 2011, vol. 179, pp. 293-299.
- [38] BELCARO, G. et al.: Efficacy and Safety of Meriva, a Curcumin - phosphatidylcholine Complex, during Extended Administration in Osteoarthritis Patients. *Alternative Medicine Review*. 2010, vol. 15, no. 4, pp. 337-344.
- [39] HE, et al.: Upregulation of p53 expression in patients with colorectal cancer by administration of curcumin. *Cancer invest*. 2011, vol. 29, no. 3, pp. 208-213.
- [40] KILLIAN, et al.: Curcumin inhibits prostate cancer metastasis in vivo by targeting the inflammatory cytokines CXCL1 and -2. *Carcinogenesis* 2. 2012.
- [41] PALATTY, et al.: Topical application of a sandal wood oil and turmeric based cream prevents radiodermatitis in head and neck cancer patients undergoing external beam radiotherapy: a pilot study. *The British Journal of Radiology*. 2014, vol. 87.
- [42] *Fyziologie trávení a vstřebávání* [online]. 2016, duben [cit. 2016-04-20]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/~mpesl/trafficjam/Prirodu/priro/kap13.pdf>
- [43] LEVI, S., RAC, V., MANOJLOVI, V., RAKI, V., BUGARSKI, B., FLOCK, T., KRZYCZMONIK, K. E., NEDOVIC, V.: Limonene encapsulation in alginate/poly (vinyl alcohol). *Procedia Food Science*, 2011, vol. 1, pp. 1816–1820.
- [44] NEDOVIC, V., KALUSEVIC, A., MANOJLOVIC, V., LEVIC, S., BUGARSKI, B.: An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 2011, vol. 1, pp. 1806–1815.
- [45] BASU, S. C., BASU, M.: *Liposome methods and protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press, 2002. 249 p. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), vol. 199. ISBN 0896038459.

- [46] CRABIELLE-MADELMONT, C., LESIEUR, S., OLLIVON, M.: Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2003, vol. 56, pp. 189-217.
- [47] GREGORIADIS, G.: *Liposome technology: Liposome Preparation and Related Techniques*. New York: Informa Healthcare, 2007. 324 p. ISBN 978-0-8493-8821-7.
- [48] ZAHAVY, E., ORDENTLICH, A., YITZHAKI, S., SHAFFERMAN, A.: *Nano-Biotechnology for Biomedical and Diagnostic Reserch*. London: Spriger Science, 2012. 182 p. ISBN 987-94-007-2555-3.
- [49] RICKWOOD, D., HAMES, B. D.: *Liposomes a practical approach*. IRL-Press Oxford, 1990. 420 p. ISBN 978-0-19-963654-9.
- [50] LASIC, D. D.: *Liposomes in gene delivery*. CRC-Press, 1997. 320 p. Boca Raton. New York. ISBN 978-0849331091.
- [51] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 3. 2. upr. vyd.* Tábor: OSSIS, 2002. 368 s. ISBN 80-86659-02-X.
- [52] KLOUDA, P.: *Základy biochemie*. 1. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2000. 155 s. ISBN 80-86369-00-5.
- [53] MÁROVÁ, I., OBRUČA, S.: *Vybrané instrumentální úlohy z aplikované biochemie*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. ISBN 978-802-1447-882.
- [54] PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H., TÁBORSKÁ, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické listy*, 2004, roč. 98, s. 174-179. ISSN 0009-2770.
- [55] PRAKASH, A., RIGELHOF, F., MILLER, E.: Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories* [online]. 2016, duben [cit. 2016-04-08]. Dostupné z: http://www.medallionlabs.com/downloads/antiox_acti_.pdf.
- [56] ZLOCH, Z., ČELAKOVSKÝ, J., AUJEZDSKÁ, A.: *Stanovení polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu*. Plzeň: Ústav hygieny Lékařské fakulty UK. 2004. 37 s.
- [57] KARADAG, A., OZCELIK, B., SANER, S.: Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2009, 2, pp. 41-60.
- [58] NACZK, M., SHAHIDI, F.: Phenolics in cereals, fruits and vegetables. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, vol. 41, no. 5, pp. 1523-1542.
- [59] GRUBEŠIĆ, R. J., KREMER, D., KONČIĆ, M. Z., RODRÍGUEZ, J. V., RANDIĆ, M.: Quantitative analysis of polyphenols and antioxidant activity in four Daphne L. species. *Central European Journal of Biology*, 2012, vol. 7, no. 6, pp. 1092–1100.
- [60] KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*, 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s.

- [61] ZAMAN, W., AKRAM, M., REHMAN, R., ANWAR, J.: Statistical Analysis and Quantification of Alpha Tocopherol in Edible Seeds and Nuts of Pakistan by Reversed Phase HPLC with UV/Visible Detector. *Journal of The Chemical Society Of Pakistan*, 2012, vol. 34, no. 2, pp. 302-305.
- [62] BENSON, J.: Curcumin. *Alternative Medicine*, [online], 2014, vol. 19, pp. 60-61. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/1643098845?accountid=17115>.
- [63] DOBEŠ, J., SOCHOR, J., RUTTKAY-NEDECKÝ, B., ADAM, V., KIZEK, R., KLEJDUS, B.: *Stanovení antioxidační aktivity přírodních antioxidantů pomocí automatického robota a spektrofotometru*. [online]. 2016, duben [cit. 2016-04-08]. Dostupné z: https://mnet.mendelu.cz/mendelnet2012/articles/39_dobes_669.pdf.
- [64] *Steatóza jater* [online]. 2016, duben [cit. 2016-04-08]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/?q=steatoza-jater>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS	2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonát)
α -TTP	jaterní přenašečový protein pro α -tokoferol
EU	enkapsulační účinnost
GIT	gastrointestinální trakt
HDL	high - density lipoprotein
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	low - density lipoprotein
PDA	detektor diodového pole
UV	ultrafialové záření
VLDL	very low - density lipoprotein