

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOGNOSIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Antioxidační vlastnosti extraktů rostlinných drog

Vypracovala: Zuzana Neckářová

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Oponent:

Datum zadání: 15.12. 2006

Termín odevzdání: 15.5. 2008

Datum obhajoby:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a veškeré literární
prameny a zdroje informací, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu literatury.

V Hradci Králové 15.5.2008

Zuzana Neckářová

Děkuji Doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc., za odborné vedení, pomoc a cenné rady při vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji všem pracovníkům katedry farmakognozie za pomoc a spolupráci při praktické realizaci studie.

Obsah

1. Úvod	6
2. Cíl práce	10
3. Teoretická část	11
3.1. Ochranné systémy organismu proti působení volných radikálů	11
3.1.1. Enzymové antioxidanty.....	11
3.1.2. Neezymové antioxidanty.....	12
3.2. Superoxid	18
3.2.1 Definice a vznik.....	18
3.2.2. Superoxid jako součást účinné zbraně fagocytů proti bakteriím a cizorodým strukturám.....	18
3.2.3 Poškození biomolekul způsobené ROS.....	19
3.3. DPPH	19
3.4. Rod ptačinec – <i>Stellaria L.</i>	21
3.4.1. <i>Stellaria media</i> (L.) Vill. - ptačinec prostřední.....	21
3.4.2. Další druhy u nás rostoucí.....	23
3.5. Obsahové látky	29
3.6. Účinky a použití	36
3.6.1. Terapeutické využití.....	36
3.6.2. Ostatní využití.....	36
4. Experimentální část	38
4.1. Rostlinný materiál	38
4.2. Přístroje	38
4.3. Chemikálie	38
4.4. Farmakognostické hodnocení drogy	39
4.4.1. Mikroskopie.....	39
4.4.2. Tenkovrstevná chromatografie.....	39
4.4.2.1. Důkaz flavonoidů.....	39
4.4.2.2. Důkaz saponinů.....	40
4.4.3. HPLC.....	40
4.4.3.1. Úprava vzorku.....	40
4.4.3.2. Podmínky HPLC.....	40
4.4.4. Stanovení ztráty sušením.....	41

4.4.5. Celkový popel.....	41
4.4.6. Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové.....	41
4.4.7. Stanovení extraktivních látek.....	41
4.4.8. Stanovení obsahu flavonoidů.....	42
4.4.9. Stanovení obsahu kyseliny askorbové.....	43
4.5. Antiradikálová aktivita.....	44
4.5.1. Testování antiradikálové aktivity s DPPH.....	44
4.5.1.1. Příprava základního roztoku DPPH.....	44
4.5.1.2. Methanolvý extrakt.....	44
4.5.1.2.1. Postup stanovení antiradikálové aktivity I.....	45
4.5.1.2.2. Postup stanovení antiradikálové aktivity II.....	45
4.5.1.3. Methanolvý extrakt vytřepaný petroletherem.....	45
4.5.1.4. Vodně-methanolvý extrakt.....	46
4.5.1.5. Vodně-methanolvý extrakt vytřepaný petroletherem.....	46
4.5.1.6. Methanolvý extrakt zbavený lipofilních látek.....	46
4.5.1.7. Vodný výluh.....	46
4.5.1.7.1. Příprava vodného výluhu.....	46
4.5.1.7.2. Příprava vzorku pro měření zhášení radikálu DPPH.....	47
4.5.2. Testování antiradikálové aktivity vůči superoxidovému radikálu.....	47
4.5.2.1. Příprava vodného výluhu drogy.....	47
4.5.2.2. Příprava činidel pro stanovení antioxidační aktivity.....	47
4.5.2.3. Měření antioxidační aktivity.....	48
5. Výsledky.....	50
6. Diskuze.....	69
7. Závěr.....	72
8. Literatura.....	73
9. Abstrakt.....	74

1. Úvod

Antioxidační ochrana organismu je složitý proces mechanismů, které musí být v rovnováze s produkcí volných radikálů. V dnešní době volné radikály díky lidské činnosti stále přibývají, a proto je rovnováha mezi nimi a antioxidanty stále narušována. Nadbytek volných radikálů, který může být způsoben jejich zvýšenou tvorbou, snížením koncentrace antioxidantů nebo kombinací obou stavů, se označuje termínem *oxidační stres*. Převaha volných radikálů, ale i antioxidantů může způsobovat vážná poškození organismu.

Volné radikály (atomy, molekuly nebo ionty) vyznačující se nepárovým elektronem ve svém elektronovém obalu, jsou schopné existovat samostatně. V biologických systémech hrají dvojí roli. Na jedné straně tyto velmi nestabilní a reaktivní částice vyvolávají řetězové reakce, které mohou poškodit jakoukoliv molekulu organismu a způsobit její oxidační poškození. Chybějící elektron se doplňuje z jiných radikálů nebo častěji z „nepoškozených“ molekul, z kterých se stává radikál, který pak dále napadá další molekuly. Může tak docházet k poškození fosfolipidů buněčných membrán, která vedou k poruše životně důležitých membránových dějů, až k zániku buňky nebo k poškození nukleových kyselin a DNA. Výsledkem může být mutageneze, karcinogeneze, či zánik buňky. Při oxidačním poškození bílkovin dochází k inaktivaci enzymů a jiných bílkovin (1). Na druhé straně organismus využívá volné radikály jako ochranu proti infekčním agens, hrají důležitou roli v signálních systémech buňky a v indukci mitogenní aktivity. Proto jejich vzájemné ovlivňování a rovnováha udržuje žádoucí stav organismu (2).

Velká pozornost je zaměřena především na působení volných radikálů v živém organismu. Jedná se hlavně o reaktivní kyslíkové radikály (ROS) a o reaktivní dusíkové radikály (RNS). Příklady uvádí tab.1 (4).

Tab. č.1: Nejčastější formy ROS a RNS

REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU (ROS)	
Radikály s nepárovým elektronem	Látky bez nepárového elektronu
Hydroxylový radikál $\cdot\text{OH}$	Kyselina chlorná HOCl
Superoxidový radikál $\text{O}_2^{\cdot-}$	Peroxid vodíku H_2O_2
Alkylperoxylový radikál $\text{ROO}\cdot$	Singlet kyslíku $^1\text{O}_2$
Alkoxylový radikál $\text{RO}\cdot$	Ozón O_3
Hydroperoxydový radikál $\text{H O}_2\cdot$	

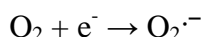
Tab. č.1: Nejčastější formy reaktivních forem kyslíku a dusíku – pokračování

REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU (RNS)	
Radikály s nepárovým elektronem	Látky bez nepárového elektronu
Oxid dusnatý NO·	Peroxynitrit ONOO ⁻
	Nitroxid NO [·]
	Nitrosyl NO ⁺
	Kyselina dusitá HNO ₂
	Oxid dusný N ₂ O ₃
	Nitronium NO ₂ ⁺

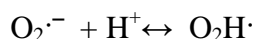
Mezi radikály reagující velmi ochotně s ROS se řadí atomy přechodných kovů (železo, měď, nikl, mangan, titan a další), neboť mají předposlední vrstvu elektronového obalu neúplně obsazenou elektrony (1).

Celková redukce molekulárního kyslíku:

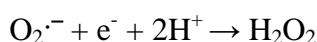
V první reakci je molekulární kyslík redukován za vzniku superoxidového radikálu. Mediátorem této reakce je NAD(P)H oxidasa a xantinoxidasa (2).



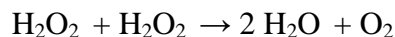
V živých buňkách superoxidový radikál existuje v rovnováze se svou protonovanou formou, hydroperoxylovým radikálem, O₂H·, který zahajuje oxidaci lipidů (5).



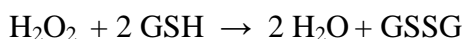
Superoxidový radikál se dále redukuje na peroxid vodíku a katalyzátorem této reakce je superoxiddismuthasa (SOD) (2).



Nově vzniklý peroxid může reagovat s další molekulou peroxidu za vzniku kyslíku a vody, kde katalyzátorem je kataláza (5),



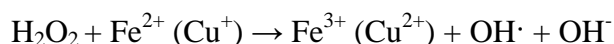
nebo účinkem enzymu GSHPx může vytvářet 2 molekuly vody. Glutathionperoxidasa vyžaduje ke své aktivitě glutathion (GSH) jako donor elektronů, který se při této reakci oxiduje na oxidovaný glutathion (GSSG). Oxidovaný glutathion je zpětně redukován glutathionreduktasou za pomoci NADPH (2).



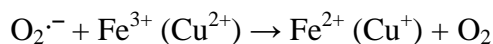
V dalším stupni redukce vzniká velmi reaktivní hydroxylový radikál OH·, který se může tvořit přímou reakcí peroxidu vodíku a superoxidu, tzv. Haberova-Weissova reakce.



Podstatně větší množství hydroxylového radikálu se vytváří při oxidaci přechodných kovů (Fe, Cu) v tzv. Fentonově reakci.

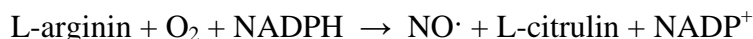


Regenerace oxidovaných kovů zpět na redukovanou formu probíhá za reakce se superoxidovým radikálem (5).



Reaktivní formy dusíku:

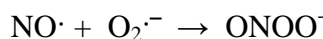
Radikál oxidu dusnatého $\text{NO}\cdot$ je malá molekula, která je generována v biologických tkáních specifickou synthasou oxidu dusnatého (NOS), která přeměňuje L-arginin na radikál oxidu dusnatého a L-citrulin.



$\text{NO}\cdot$ je důležitá signální molekula, která se účastní mnoha fyziologických procesů, regulace tlaku krve, relaxace hladkého svalstva a regulace imunitního systému a v extracelulárním systému $\text{NO}\cdot$ reaguje s kyslíkem za vzniku nitrátů a nitrátového aniontu.

Pokud dochází k nadprodukci reaktivního dusíkatého radikálu, tento stav je označován termínem *dusíkatý stres*.

Buňky imunitního procesu produkují při zánětlivých procesech jak dusíkatý radikál, tak i superoxidový radikál. Tyto molekuly spolu reagují za vzniku velmi reaktivního peroxynitrátového anionu (ONOO^-), který může poté způsobit fragmentaci DNA a oxidaci lipidů (2).



Zdroje volných radikálů ROS a RNS v živých organismech

Za hlavní zdroj ROS jsou považovány chloroplasty, v nichž dochází k redukcí kyslíku. Primárním produktem této reakce je superoxidový radikál, z kterého se mohou tvořit další reaktivní radikály (5).

Dalším důležitým místem tvorby volných radikálů jsou mitochondrie, ve kterých vzniká superoxidový radikál, který je považován za primární reaktivní formu kyslíku a může dále reagovat s dalšími molekulami a vytvářet tak sekundární ROS (např. peroxid vodíku) za účasti NAD(P)H (2).

Peroxisomy jsou odpovědné za tvorbu peroxidu a superoxidového radikálu, který se vytváří v matrix peroxisomu za přítomnosti XO a na membráně peroxisomu za účasti ferrichelátredutasy a Cyt b. Rychle se pak přeměňuje na reaktivnější radikály.

Endoplazmatické retikulum, plazmatická membrána a cytP450 (2) jsou dalšími zdroji superoxidu. Buněčná stěna a apoplast (oxalát oxidasa a aminoxidasa) jsou producenty peroxidu vodíku.

Aktivní formy kyslíku mohou také vznikat cestou enzymových reakcí. Nejznámějším enzymem je xanthinoxidasa (XO). Při katalytické oxidaci xanthinu na kyselinu močovou se uvolňuje superoxidový radikál, který se dále redukuje na peroxid vodíku a hydroxylový radikál. Jiným enzymem tvořícím superoxidový radikál je aldehydoxidasa, která obsahuje stejně jako XO molybden a je tak schopna katalyzovat oxidaci aldehydu. Při reakci, která je katalyzována lipoxygenasou, dochází k peroxidaci polynenasycených mastných kyselin, peroxidderivátů, které následně podléhají degradaci, při které vznikají radikály způsobující řetězové reakce peroxidace lipidů (5).

Také neutrofilové jsou označovány jako producenty superoxidového radikálu (2).

Dalšími zdroji volných radikálů mohou být exogenní příčiny jako je například ionizující záření, UV-světlo, velké množství škodlivin v ovzduší, kouření, polychlorované bifenyly, tetrachlormethan aj.(1).

2. Cíl práce

Cílem práce byl fytochemický výzkum obsahových látek *Stellaria media* (L.) Vill., farmakognostické hodnocení drogy *Stellaria media* (L.) Vill. a stanovení antiradikálové aktivity výluhů vůči radikálu DPPH a superoxidového radikálu.

3. Teoretická část

3.1. Ochranné systémy organismu proti působení volných radikálů

Organismus se může bránit proti volným radikálům indukujícím oxidační stres preventivními a opravnými mechanismy, fyzikálními bariérami nebo působením antioxidantů enzymatického i neenzymatického původu.

3.1.1. Enzymové antioxidanty

Superoxiddismuthasa (SOD)

Superoxiddismuthasa, metaloenzym, katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu za vzniku peroxidu vodíku, který je odstraněn enzymem glutathionperoxidasou nebo katalasou (5).

Rozlišují se tři druhy izoenzymů SOD, lišící se kofaktorem, atomem kovu, který hraje velkou roli v katalytickém účinku enzymu. V mitochondriích se nachází Mn/SOD, v cytoplazmě Cu, Zn/SOD a extracelulární SOD.

Zvýšená aktivita Cu/SOD může způsobovat revmatoidní artritidu, Alzheimerovu chorobu, *diabetes mellitus*, hyperlipoproteinémii aj.

Glutathionperoxidasa (GSHPx)

GSHPx je důležitý nitrobuněčný enzym, selenoprotein, který se podílí na deaktivaci peroxidu vodíku a lipidových hydroperoxidů. Jeho aktivita je závislá na dostatku GSH, selenu a redukované formy koenzymu NADPH, který oxidovaný glutathion GSSG zpětně regeneruje na jeho aktivní formu GSH enzymem glutathioreduktázou.

GSHPx se vyskytuje ve třech formách.

První dvě formy se nacházejí v cytoplazmě buněk (cGSHPx) a v krevní plazmě (eGSHPx) a ve svém aktivním centru mají aminokyselinu selenocystein.

Třetí typ, fosfolipidová glutathionperoxidasa (pGSHPx), je vázána v buněčné membráně. Tento enzym redukuje jak peroxid vodíku, tak i lipidové hydroperoxydy, které přeměňuje na příslušné hydroxylové deriváty lipidů. Tím jsou fosfolipidy buněčných membrán chráněny a přerušuje se tím řetězová reakce poškození jejich lipidů volnými radikály (lipoperoxidace).

Katalasa (CAT)

CAT je enzym štěpící peroxid vodíku na vodu a kyslík. V lidském organismu se nejvíce vyskytuje v mitochondriích, peroxisomech hepatocytů a v cytoplasmě erythrocytů. Tyto buňky chrání před toxickým vlivem vyšší koncentrace peroxidu vodíku (navazuje na činnost SOD).

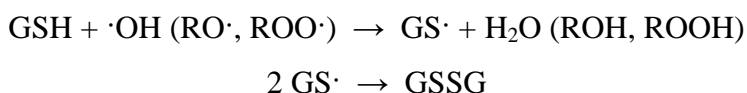
Jak SOD, tak i GSHPx působí ve velmi malých koncentracích, narozdíl od CAT, která působí na peroxid ve velmi vysokých koncentracích (1).

3.1.2. Neezymové antioxidanty

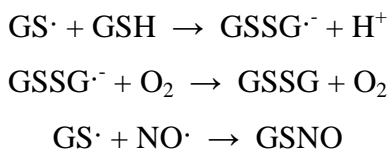
Glutathion (GSH)

Glutathion, se vyskytuje v cytosolu, jádře a v mitochondriích a je hlavním intracelulárním rozpustným antioxidantem (1) a hlavní zásobárnou síry (5). Chemicky se jedná o tripeptid γ -glutamylcysteinylglycin, který se vyskytuje ve dvou formách. Ve formě redukované jako thiol (GSH) a ve formě oxidované jako disulfid (GSSG). Aby nedocházelo k narušení antioxidační kapacity buňky, organismus tyto formy udržuje v rovnováze.

Hlavním úkolem je ochrana bílkovin obsahujících thiolovou skupinu, nezbytnou pro jejich funkci, a také chrání DNA v buněčném jádře před oxidačním poškozením (1). Zabráňuje peroxidaci lipidů odstraněním lipidových alkynů nebo lipoxylových radikálů. Dále je také kofaktor enzymů (GSHPx a glutathiontransferasa) působící proti oxidačnímu stresu. Ničí přímo hydroxylový radikál, superoxid, odstraňuje cytotoxický peroxid vodíku (5) a je schopen znovu vracet aktivitu důležitým antioxidantům, vitaminu C a E.



Reakcí glutathiolového radikálu ($\text{GS}\cdot$) s molekulou GSH může vzniknout radikál oxidovaného glutathionu ($\text{GSSG}\cdot^-$), který je schopný redukovat kyslík na superoxidový radikál. Glutathionový radikál reaguje také s radikálem oxidu dusnatého a tvoří reaktivní nitrosothiol.



U kouření, diabetes mellitus, intoxikaci alkoholem, infarktu myokardu, ale i po vysilujícím tréninku byla zjištěna nižší hladina redukovaného glutathionu, resp. poměru GSH/GSSG.

Kyselina askorbová

Vitamin C, velmi důležitý antioxidant má nezastupitelnou roli v oxidoredukčních dějích. Podílí se na obranyschopnosti organismu, na řadě metabolických drah, je významným reduktantem velkého množství volných radikálů a je kofaktorem řady enzymů (účastní se metabolismu cholesterolu, při biosyntéze kolagenu nebo noradrenalinu aj.). Za pomoci kyseliny askorbové je Fe^{3+} v trávicím traktu redukován na Fe^{2+} , které se tak dále může vstřebávat (1). Vitamin C je schopný vylučovat jak superoxid, hydroxylový radikál, singletový kyslík, tak i redukovat peroxid vodíku na vodu (5).

Kyselina askorbová se oxiduje působením volných radikálů do dvou stupňů. Na semidehydroaskorbát (askorbylový radikál) a dehydroaskorbát. V buňkách se převážně vyskytuje kyselina askorbová (AA), kyselina dehydroaskorbová (DHAA) je ihned rozkládána. Hromadění DHAA zvyšuje citlivost k oxidačnímu poškození.

Kyselina askorbová je důležitá pro regeneraci vitamínu E a obnova její antioxidační aktivity probíhá za účasti GSH, který mění askorbátový radikál zpět na kyselinu askorbovou.

Nízká koncentrace vitamínu C byla zjištěna u kuřáků, pacientů s těžkými infekcemi, karcinomem trávicího traktu, hypertenzi, po akutním infarktu myokardu, s *diabetes mellitus* a při dalších onemocnění.

α -tokoferol

Vitamin E je skupina osmi izomerů tokoferolu, z nichž nejúčinnější je α -tokoferol. Je to membránový antioxidant, který hraje nejdůležitější roli v antioxidační ochraně lipidů biologických membrán a lipoproteinových částic plazmy. Při peroxidaci lipidů dochází k řetězové reakci, při které se štěpí uhlíkový řetězec a vznikají tak reaktivní aldehydy a alkany. Tokoferol přerušuje řetězec lipoperoxidace a alkylperoxylové radikály lipidů tak nemohou napadat další molekuly mastných kyselin. Vitamin E se však při reakci s volným radikálem mění na tokoferoxylový radikál, ztrácí svou antioxidační aktivitu a je schopen napadat a poškozovat další biomolekuly. Ve většině případů však tokoferový radikál reaguje s dalšími lipidovými peroxylovými radikály za vzniku neradikálových produktů.

Další funkcí α -tokoferolu je odstranění singletového kyslíku z buněk a spolu s askorbátem a redukováným glutathionem se podílejí na inhibici oxidačního poškození buněčných membrán.

V lipoproteinových částicích je vitamínu E omezené množství, proto je důležitá jeho regenerace, kterou zajišťuje kyselina askorbová.

Zda je vitamin E prospěšný pro lidský organismus je předmětem diskuzí. Mnohé studie potvrdily, že podáváním vitaminu bylo sníženo riziko vzniku aterosklerózy nebo při suplementaci tohoto vitaminu se snížila morbidita a mortalita na ischemickou chorobu srdeční. Při některých dalších pozorováních však účinnost nebyla potvrzena, nebo byla dokonce vyvrácena.

Ubichinon (Koenzym Q₁₀)

Koenzym Q₁₀, vyskytující se prakticky ve všech buňkách, hlavně v mitochondriích, je látka důležitá pro tvorbu a využití energie v organismu. Uplatňuje se při přenosu elektronů v dýchacím řetězci.

Ubichinol chrání před oxidací LDL a podílí se i na regeneraci kyseliny askorbové v extracelulární tekutině.

Suplementace je vhodná u kardiálních onemocněních, neurodegenerativních onemocněních a u sportovců, u kterých ubichinon snižuje počet arytmií, krevní tlak a zvyšuje jejich sportovní výkon.

Karotenoidy

Karotenoidy jsou pigmenty rostlinného původu patřící do skupiny terpenů. Jsou to lipofilní látky, pro jejichž vstřebávání v tenkém střevě jsou nutné žlučové kyseliny a neporušená absorpce lipidů. β -karoten (největší zdroj vitaminu A), α -karoten, lykopen, lutein a zeaxantin patří mezi nejdůležitější karotenoidy. Vitamin A, retinol, se v sítnici mění na retinal, který je důležitý pro vidění.

β -karoten tvořící 90% všech karotenoidů velmi účinně zhasí singletový kyslík a je schopný likvidovat volné radikály. Působí také jako inhibitor lipoxygenázy a klíčového enzymu biosyntézy cholesterolu. Antioxidační aktivita vitaminu A je však zanedbatelná.

Kyselina močová

Je to konečný katabolit purinových bází. Váže se přímo na volné radikály a vzniklý urátový radikál je regenerován kyselinou askorbovou. Další funkcí je schopnost kyseliny močové vázat ionty železa ve formě pevného chelátu, a tím zabraňuje vytvoření hydroxylového radikálu Fentonovou reakcí. Chrání kyselinu askorbovou před oxidací navázáním železa a také chrání α -tokoferol před oxidací.

Koncentrace kyseliny močové se zvyšuje např. po těžké námaze, v počáteční fázi diabetu nebo po kardiochirurgických operacích (1).

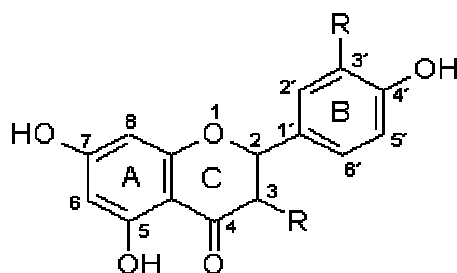
Polyfenoly

Do skupiny polyfenolů spadá velké množství látek vyskytujících se v rostlinné stravě, hlavně v ovoci, zelenině, zeleném čaji nebo červeném víně. Jejich společným rysem je jedno nebo více aromatických jader substituovaných hydroxylovými skupinami.

Fenolické látky se rozdělují do tří základních skupin: fenolické kyseliny, flavonoidy a skupina stilbenů a lignanů.

Fenolické kyseliny jsou nejvíce zastoupeny hydroxyskořicovými kyselinami, zejména ve formě esterů. Nejčastěji je to kyselina kávová a její estery - kyselina chlorogenová, která se hojně nachází v ovoci, zelenině a v kávě. Dalšími látkami jsou kyselina ferulová a kondenzované taniny (kyselina galová) (6).

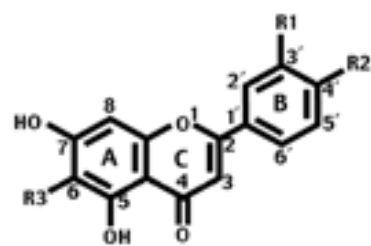
Mezi nejvýznamější a nejběžnější polyfenoly patří flavonoidy. Jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma benzenovými jádry spojenými heterocyklickým pyranem. Všechny tři kruhy bývají substituovány hydroxy- nebo methoxy-skupinami (7) a nejčastěji se vyskytují ve formě O-glykosidů (ve své molekule obsahují necukernou část - aglykon a cukernou složku) (8).



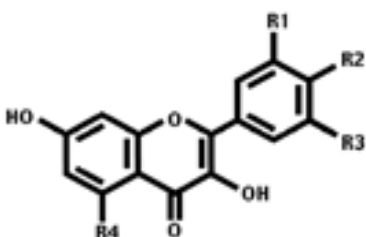
flavonoid

Podle stupně oxidace pyranového kruhu se dělí do několika hlavních tříd, které jsou uvedeny v tab. č. 3 spolu se základní strukturou (8).

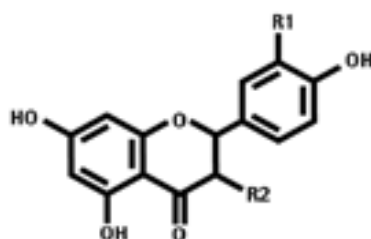
Tab.č.2: Hlavní třídy flavonoidů a jejich struktury



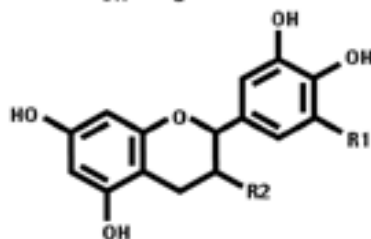
Flavone	R1	R2	R3
Apigenin	H	OH	H
Baicalein	H	H	OH
Luteolin	OH	OH	H



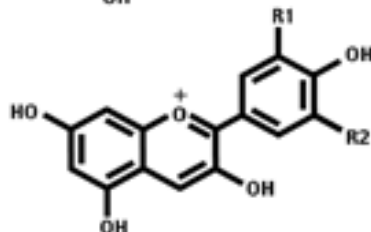
Flavonol	R1	R2	R3	R4
Fisetin	OH	OH	H	H
Galangin	H	H	H	OH
Quercetin	OH	OH	H	OH
Kaempferol	H	OH	H	OH
Myricetin	OH	OH	OH	OH
Isorhamnetin	H	OH	OMe	OH



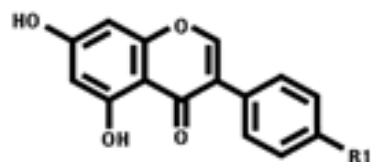
Flavanone	R1	R2
Eriodictyol	OH	H
Naringenin	H	H
Taxifolin	OH	OH



Flavanol	R1	R2
Catechin	H	OH
Epicatechin	H	OH
EGCG	OH	Gallate



Anthocyanidin	R1	R2
Cyanidin	OH	H
Malvidin	OMe	OMe
Peonidin	OMe	H



Isoflavone	R1
Genistein	OH

Flavonoidy jsou důležitou součástí antioxidačního systému. Jejich účinek spočívá v redukci volných radikálů: váží peroxylové, hydroxylové a superoxidové radikály a peroxid vodíku, dále přispívají k regeneraci vitamínu E a C (1), inhibují enzymy zodpovědné za produkci superoxidu (xanthinoxidasu) nebo enzymy, které katalyzují vznik volných

radikálů (cyklooxygenasa, lipoxygenasa ad.) (6), váží přechodné kovy do stabilních chelátů (např. Fe a Cu), a tím zamezují vzniku hydroxylového radikálu.(1)

Antioxidační aktivita flavonoidů je závislá na počtu a poloze hydroxylových skupin a na poloze dvojných vazeb heterocyklického jádra. Vliv má i jejich glykosylace. Jejich antioxidační schopnost byla nalezena pro:

- o-dihydroxy strukturu v kruhu B
- 2,3 dvojnou vazbu a 4-oxo funkční skupinu v kruhu C
- 3 a 5-OH skupiny na kruzích A a C (7)

Přírodní flavonoidy jsou významné antioxidanty, které přispívají k prevenci onemocnění mající souvislost s oxidačním poškozením biomembrán. Jedná se především o atherosklerózu, kardiovaskulární onemocnění, neurodegenerativní onemocnění a rakovinu.

Skupina stilbenů a lignanů jsou další skupinou polyfenolových antioxidantů. Nejvýznamnější látkou stilbenů je resveratrol, který se vyskytuje ve slupkách hroznového vína (6).

Melatonin

Melatonin je hormon produkováný v epifýze, v retině a dalších tkáních. Deaktivace nitroxidového, peroxylového a hydroxylového radikálu, blokace účinek singletového kyslíku a ochrana před lipoperoxidací jsou hlavní účinky melatoninu. Také chrání DNA před hydroxylovým radikálem.

Antioxidanty, které byly uvedeny, tvoří jen malé procento z celkového množství všech antioxidantů. Svým významem však patří mezi ty nejvýznamnější.

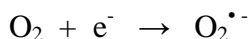
V dnešní době díky stravovacím návykům, životnímu stylu a zhoršujícímu se životnímu prostředí stále více přibývá volných radikálů a díky tomu narůstá i počet vážných onemocnění. Proto cílem každého člověka by měla být dostatečná konzumace antioxidantů a stopových prvků, ať z potravy, nebo ve formě léčiv, neboť bylo prokázáno, že preventivní užívání těchto látek je mnohem efektivnější, než jejich podávání v průběhu chorob.

Na druhou stranu i nadměrné množství antioxidantů může mít na organismus škodlivý vliv. Blokují účinky volných radikálů, které jsou příznivé a nezbytné pro organismus. Dokonce přebytek antioxidantů může zvyšovat *oxidační stres*. Např. kyselina askorbová redukcí Fe^{3+} na Fe^{2+} umožní vzniknout hydroxylovému radikálu Fentonovou reakcí. Následkem toho dochází k oxidačnímu poškození organismu (1).

3.2. Superoxid

3.2.1. Definice a vznik

Základním zdrojem ROS v buňce je respirační řetězec mitochondrií, v němž se primárně tvoří superoxid. Vzniká jednoelektronovou redukcí kyslíku a patří mezi nejčastěji se objevující radikál v živých organismech.



Také může vznikat při přeměně xanthinu na kyselinu močovou (1) nebo v endoplazmatickém retikulu z oxykomplexu cytochrom P-450. V leukocytech a makrofázích je produkován NADPH-oxidázou a velmi malé množství se tvoří při náhodné oxidaci hemoglobinu na methemoglobin.

Superoxid má jak oxidační, tak i redukční vlastnosti. Superoxidové radikály podléhají dizmutaci, při které jedna molekula poskytuje elektron druhé a produkty reakce jsou pak kyslík a peroxid vodíku. V organismech je tato přeměna urychlována superoxidodismutase (9).



Superoxid může být velmi nebezpečný. Většina poškození molekul, která mohou být způsobena radikálem superoxidu je následkem jeho přeměny v mnohem reaktivnější, velmi nebezpečné látky jako hydroxylový radikál, peroxyinitrit, kyselina chlorná a již zmíněný peroxid vodíku. (1).

3.2.2. Superoxid jako součást účinné zbraně fagocytů proti bakteriím a cizorodým strukturám

Leukocyty a makrofágy používají reaktivní formy kyslíku k odstranění zbytků mrtvých buněk a k zabíjení bakterií. Při pohlcení cizích částic aktivují na své plazmatické membráně enzymový komplex NADPH-oxidasy, který redukuje dioxygen na superoxidový radikál. Takto aktivované buňky zvýší spotřebu kyslíku (*respirační vzplanutí*), nikoli však činností mitochondrií. Vznikající superoxid se mění na peroxid vodíku, který dále reaguje s Fe^{2+} (uvolňují se ze zásob vlivem kyselého prostředí ve fagocytu) za tvorby hydroxylového radikálu OH^{\bullet} .

V makrofázích a neutrofilech a jiných buňkách je aktivována účinkem cytokininů a mikrobů NO-syntasa, díky které vzniká velké množství NO^{\bullet} (reakce: arginin \rightarrow citrulin + NO^{\bullet}). Tento radikál se nestačí plně odstranit difúzí do krve, a proto reaguje s přítomným superoxidovým radikálem na peroxyinitrit, který působí baktericidně.

3.2.3. Poškození biomolekul způsobené ROS

Peroxidace lipidů

Tuky a oleje při skladování na vzduchu žluknou. Této reakci (peroxidace lipidů) podléhají polyenové mastné kyseliny (PUFA). Každá látka, která dokáže vytrhnout vodíkový atom z methylenové skupiny uhlíkového řetězce mastné kyseliny (-CH₂-), může zahájit radikálovou reakci v membránových lipidech. Mezi tyto látky patří nejen hydroxylový, alkoxylový, peroxylový radikál, ale i superoxid ve formě hydroperoxylového radikálu (HO₂[•]).

Poškození proteinů

Volné radikály mohou rovněž reagovat s buněčnými proteiny, vytvořit proteinové radikály a tím i inaktivovat určité membránové proteiny, které ztrácí svou enzymovou, signální a transportní funkci.

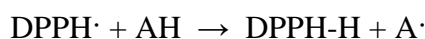
Poškození DNA

Hlavně hydroxylový radikál, ale i superoxid způsobují modifikaci bází. Ze všech čtyř bází DNA generuje mnohonásobné produkty. 5-hydroxymetyltracytin a 8-hydroxyadenin a thymidinylosukcin, pak způsobují mutace DNA nebo řetězové zlomy (9).

3.3. DPPH

DPPH, 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (α,α -difenyl- β -picrylhydrazyl), je stabilní radikál, který se využívá k testování antiradikálové aktivity. Používá se pro zjištění schopnosti extraktů zhaset volné radikály a je charakteristický účinnou delokalizací volných elektronů v molekule (10). Náhodný elektron v DPPH volném radikálu poskytuje absorpční maximum 517 nm a projevuje se fialovým zbarvením (11).

Pokud je methanolvý roztok DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) (3), smíchan se vzorkem, který je donorem atomu vodíku, z DPPH vzniká redukovaná forma DPPH-H (difenylpikrylhydrazin) a dochází ke ztrátě fialového zbarvení.



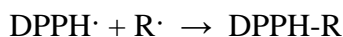
DPPH[•] ... DPPH radikál

AH ... donor elektronů

DPPH-H ... redukovaná forma

A[•] ... volný radikál

Druhý radikál (A[•]) poté podstupuje další reakci (10).

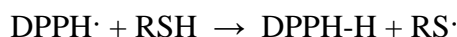


Tato metoda je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků (3). Není specifická pro

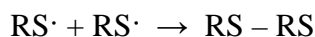
žádné konkrétní antioxidanty, ale vztahuje se k celkové antioxidační kapacitě vzorku (11). Zároveň je velmi snadno proveditelná (12).

Měření se provádí po uplynutí určitého konstantního času nebo se pracuje v kinetickém režimu (3). Fialová barva se postupně mění na žlutou díky zvyšující se schopnosti vzorku vychytávat volné radikály DPPH (11). Žluté zbarvení způsobuje pikrylová skupina, která se v DPPH vyskytuje.

Metoda využívající DPPH byla představena asi před 50 lety M. Bloisem (na Stanford University), který jako svůj model antioxidantu použil thiolovou skupinu obsaženou v aminokyselině cysteinu (10).



Volný radikál $\text{RS}\cdot$ poté reagoval s další molekulou stejného druhu, která byla vytvořena paralelní reakcí k předcházející reakci:



Z toho vyplývá, že 2 molekuly DPPH se redukuje dvěmi molekulami cysteinu. Jestliže má však sloučenina dvě sousední místa obsazená vodíky (jako je tomu u kyseliny askorbové), potom se dvě molekuly DPPH redukuje jednou molekulou sloučeniny (kyseliny askorbové) (10).

Antiradikálová aktivita je definována jako množství antioxidantu potřebného ke snížení počáteční koncentrace $\text{DPPH}\cdot$ o 50% (efektivní koncentrace = $\text{EC}_{50} \text{DPPH}\cdot$) (13), což představuje určitou koncentraci substrátu (vzorku), která způsobuje 50% ztrátu aktivity DPPH.

3.4. Rod ptačinec – *Stellaria* L.

Kosmopolitně se vyskytující rod *Stellaria* L. můžeme nalézt např. v Japonsku, a to jak na horách, tak i v zahradách (14), ve Středozeří od nížin až po úpatí hor, nebo také v Himalájích ve výškách přes 4000m n.m. (15).

3.4.1. *Stellaria media* (L.) Vill. - ptačinec prostřední

Synonyma:

Alsine media L., *S. apelata* Ucria., *Alsinula media* (L.) Dostál

Makroskopický popis:

Stellaria media (L.) Vill. (ptačinec prostřední) z čeledi *Caryophyllaceae* (Hvozdňikovité) je jednoletá, trávovitě až sytě zelená bylina. Oblé lodyhy, (5-)10-30(-40) cm vysoké, jsou vystoupavé nebo poléhavé, v uzlinách často kořenující, pokryté jednou, někdy dvěma podélnými řadami chlupů (16). Hlavní kořen chybí (17). Lodyžní listy jsou vějířité, až široce vějířité a špičaté. Dolní jsou dlouze řapíkaté, s 0,5-2,0 cm dlouhou čepelí a horní jsou přisedlé, zpravidla zřetelně větší, až 3,5 cm dlouhé. V řídkých vidlanech se nacházejí květy, jejichž stopky jsou po odkvětu sehnuté, později opět vzpřímené, často zprohýbané, za plodu 4-6x delší než kalich. Podobně jako lodyha jsou jednořadě chlupaté (16). Zpravidla má 5 volných kališních lístků (17), jejichž okraje jsou lysé, mají vějířitý až vějířitě kopinatý tvar a délku 3,0 -5,0 mm. Jsou tupě špičaté, roztroušeně až hustě žláznatě chlupaté, s blanitým bělavým okrajem nejširším v horní části a zabírajícím přibližně 1/3 jejich šířky (16). Kalich je zelený, lysý. Korunní lístky jsou bílé, obvykle jsou zřetelně až o 1/3 kratší než kališní lístky. 5 bílých okvětních lístků je delších než kalich (17). Květ obsahuje 3-5 tyčinek, prašníky jsou před vypylením purpurově fialové. Zřídka koruna chybí. Plodem jsou tobolky, které mají vejcovitý tvar, za zralosti až o 1/5 delší než kalich. Okrouhle ledvinovitá semena, 0,9-1,3 mm široká, jsou rezavě až tmavě hnědá. Hřbetní papily jsou polokulovité, tupé, přibližně stejně vysoké jako široké. Ptačinec se množí nejen semeny, ale i vegetativně. Jakýkoliv úlomek lodyhy je schopen zakořenit, stejně tak koření lodyhy položené na půdě (16). Ptačinec vytváří v krátké době velmi hustý porost, který je odolný i proti mrazu. Může kvést i v zimě (18).

Mikroskopický popis:

Lodyhy o tloušťce přibližně 1 mm mají širokou, z velkých buněk pokrytou pokožku. Na povrchu vyrůstá řada tenkostěnných, asi desetibuněčných článkových chlupů. V úzkém centrálním válci se nacházejí cévní svazky s až 20 μm širokými spirálovitými cévami. Listová epidermis se skládá z obou stran z velkých chobotnatých buněk, na obou stranách jsou též průduchy. Mezofyl obsahuje vrstvu širokých palisád a většinou 3 vrstvy buněk houbovitého parenchymu s mnoha kulovitými buňkami obsahující jemně špičaté drůzy šťavelanu vápenatého o velikosti až 70 μm .

Pylová zrnka mají hladkou, velmi jemně tečkovanou exinu s 12 kulovitými malými výstupky a jsou asi 45 μm velké. Stěna tobolek má silnou vnější epidermis z mírně podélně protáhlých, velmi slabě zvlněných nebo rovných buněk, které obzvláště v místě praskliny mají velmi silné vnější stěny. Testa tmavě hnědých semen se skládá z několika vrstev parenchymatických buněk, epidermis, který tvoří plošné, až 300 μm hluboce vybočené, téměř hvězdicovité tlustostěnné buňky. Na plochých stranách semena se vytvořily z buněk papily 30 μm vysoké, na hranách jsou cylindrické nebo kónické papily vysoké přibližně 120 μm . Jsou pokryty zrnitým povlakem a nesou obzvláště na krajích laloků svého hvězdicovitého obrysu membránovité bradavky, které se při plošném pozorování při velkém zvětšení jasně lesknou, při hlubším pozorování se jeví tmavé. Obsah buněk se skládá z tmavohnědé, zrnité substance. Tenkostěnné buňky endospermu jsou zcela zaplněny škrobovými zrnky (19).

Výskyt:

Je to jeden z drobných, ale značně rozšířených a nejúpornějších plevelů, který velmi rychle roste (18) a to na kypřených a obnažených, dusíkem bohatých půdách, na polích, v zahradách, sadech a parcích, na ruderálních stanovištích různých typů (okraje cest, úhory, rumiště a skládky, komposty apod.) i v horských polohách, ruderalizovaných okrajích lesů a pobřeží vodních toků (16).



3.4.2. Další druhy u nás rostoucí

3.4.2.1. *Stellaria nemorum* L. - ptačinec hajní

Synonyma:

Cerastium nemorum (L.) Crantz, *Alsine nemorum* (L.) Schreb.

Popis:

Patří mezi vytrvalé byliny s tenkým větveným oddenkem vyhánějícím kromě květonosných lodyh četné nadzemní listnaté 20-40 cm vysoké výhonky. Květonosné lodyhy jsou vysoké 20-100 cm, chabé, oblé, v uzlinách lámavé. V horní části jsou lodyhy měkce pýřivě chlupaté, v květenství zpravidla žláznaté. Listové okraje má roztroušeně až hustě, u listenů velmi hustě brvitě. Květy jsou velké, až 2 cm v průměru. Bylinné listeny se směrem vzhůru znenadála zmenšují. Korunní lístky jsou alespoň do $\frac{3}{4}$ dvoudílné, 2x delší než lístky kališní. Tobolky jsou o $\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{2}$ delší než kalich, otvírající se do poloviny, za úplné zralosti až k bázi 6 chloupěmi. Semena jsou nízká, širší než vysoká.

Výskyt:

Na stinných a vlhkých místech, v lesích, údolích, podhorských a horských oblastech (16).



3.4.2.2. *Stellaria neglecta* Weihe – ptačinec přehlížený

Synonyma:

Stellaria latifolia Pers., *Stellaria umbrosa* Opitz et Ruprecht, *Alsine neglecta* (Weihe) Á. et D. Löve,

Popis:

Ozimá či dvouletá bylina je zpravidla nasivěle zelená. 20-80 cm vysoké lodyhy vyrůstají jednotlivě nebo ve řídkých trsech s jednou podélnou řadou chlupů. Dolní listy jsou dlouze řapíkaté, horní mírně srdčitou bází přisedlé. V úžlabí dolních lodyžních listů vyrůstají zpravidla krátké sterilní větévky. Korunní lístky má na rozdíl od ptačince prostředního zřetelně, až o polovinu delší než lístky kališní. Semena jsou 1,3-1,7 mm

široká, kaštanově až tmavě hnědá. Kuželovité nebo válcovité hřbetní papily jsou vyšší než širší.

Výskyt:

Vyskytuje se na stinných a vlhkých březích potoků a řek a v lužních lesích (16).



3.4.2.3. *Stellaria pallida* (Dumort.) Piré – ptačinec bledý

Synonyma:

Alsine pallida Dumort., *Stellaria media* (L.) Vill. var. *apetala* Taush, *Alsinula pallida* (Dumort.) Dostál

Popis:

Tato jednoletá nebo ozimá bylina, žlutavě nebo bledě a světle zelená vyrůstá do výšky 7-35 cm. Oblé lodyhy jsou jednoduché, zřídka chudě větvené, štíhlé, jednotlivé nebo v řídkých trsech. Květy jsou malé, kališní lístky často hustě chlupaté a korunní lístky obvykle chybějí nebo jsou jen velmi malé, zakrnělé, bledě žlutozelené barvy. Prašníky před vypylením šedofialové. Semena o velikosti 0,5-0,8 mm široká jsou zpravidla bledě žlutohnědá. Polokulovité, velmi nízké hřbetní papily jsou zřetelně širší než vysoké.

Výskyt:

Tuto bylinu nalezneme na lehkých písčitých půdách, ve světlých křovinách, travnatých okrajích cest, řidčeji v parcích a městských zahradách.

V minulosti nebyl rozlišován od *Stellaria media* (L.) Vill. (16).



3.4.2.4. *Stellaria holostea* L. – ptačinec velkokvětý

Popis:

Stellaria holostea L., nejvíce se odlišující od *Stellaria media* (L.) Vill., je vytrvalá, trávovitě až sytě zelená bylina s tenkým plazivým rozvětveným oddenkem vyhánějícím kromě květonosných lodyh nadzemní, poléhavé nebo vystoupavé přezimující výhonky s obnovovacími pupeny. Lodyhy vysoké 15-35 cm jsou přímé, jednoduché, jednotlivé nebo v řídkých trsech, velmi křehké a lámavé, srstnaté nebo roztroušeně pýřnaté, zřídka lysé, zřetelně čtyřhranné, v uzlinách poněkud ztlustlé. Listy mají kopinatý až čárkově kopinatý tvar, jsou přisedlé, na bázi pochvovitě srostlé. Na rubu jsou listy nasivělé a pýřité, na okrajích hustě krátce brvitě a drsné. Květy jsou velké až 15-25 mm v průměru. Kališní lístky jsou lysé nebo velmi řídkce pýřité s nezřetelnou žilnatinou, korunní lístky jsou 1,5-2 x delší než kalich. Kulovité tobočky jsou zpravidla kratší a otevírají se do 1/3, úplně zralé až k bázi 6 chlopněmi. Semena, 1,5-2,3 mm široká, mají kaštanovitě hnědou barvu.

Výskyt:

Stellaria holostea L. se nachází ve světlých listnatých nebo smíšených lesích a hájích, na okrajích lesů a křovin, na keřnatých stráních a mezích, také na hlinitých a hlinitopísčitých půdách, většinou na živiny bohatých (16).



3.4.2.5. *Stellaria uliginosa* Murray – ptačinec mokřadní

Synonyma:

Stellaria alsine Grimm, *S. aquatica* Pollich, *Larbrea aquatica* (Pollich) S.t-Hil.

Popis:

Ptačinec mokřadní je vytrvalá, obvykle trsnatá, sivozelená bylina s nadzemními kořenujícími výhonky a 5-35 cm vysokou, čtyřhrannou, lysou lodyhou. Listy jsou eliptické až podlouhlé nebo obvejčitě kopinaté až obkopinaté. Listové báze a řapíky brvitě. Květy jsou malé, nanejvíš 7 mm v průměru. Listnatá větévka často i nejhořejší vidlan přerůstá. Kopinaté listy jsou blanité, bělavé, s úzkým zelenavým středním proužkem a na bázi

jsou roztroušeně brvité. Kališní lístky jsou trojžilné, korunní lístky dvoudílné, zřídka mohou chybět. Slabě vrásčitá semena jsou pouze 0,6-0,8 mm široká.

Výskyt:

Ptačinec mokřadní roste nejčastěji na březích potoků a řek, podmáčených lesních cestách, letněných rybnících, v mělkých písčinách až štěrkovitých řečištích, v mokřinách, bažinách a lučních strouhách (16).



3.4.2.6. *Stellaria longifolia* Willd. – ptačinec dlouholistý

Synonyma:

Stellaria diffusa Schlecht, *Stellaria mosquensis* Bieb. ex Schlecht, *S. friesiana* Ser.

Popis:

Vytrvalá, řídce trsnatá, žlutavě zelená bylina s tenkým větveným oddenkem a s nadzemními sterilními výhonky. Lodyhy jsou 10-25 cm vysoké, jednoduché nebo chudě větvené, křehké, čtyřhranné, na hranách nevýrazně rýhované, zvláště v horní části a v květenství s velmi drobnými papilami. Listy jsou čárkovitě kopinaté až čárkovité, jednožilné, v úžlabí se svazečky listů nebo krátkými sterilními větévkami. Květy jsou malé, asi 7 mm v průměru. Bělavé listeny mají zelenavý střední proužek a na okrajích jsou lysé. Kališní lístky jsou také lysé a navíc nezřetelně žilnaté. Korunní lístky jsou téměř k bázi dvoudílné, nanejvíš o 1/3 delší než kališní. Semena 0,6-0,8 mm široká jsou velmi jemně zrnitá, žlutohnědě až rezavě zbarvená.

Výskyt:

Ptačinec dlouholistý se nachází v olšínách na rašelinných půdách, lesních mokřinách, prameništích a březích vodních toků v horských a podhorských polohách. Dále se vyskytuje na vlhkých a humózních, často zrašeliněných místech v lesích podhorských a horských polohách (16).



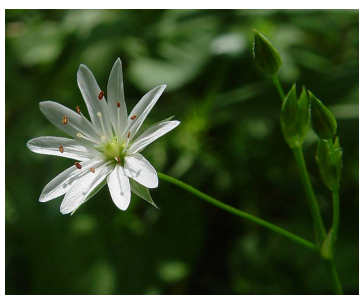
3.4.2.7. *Stellaria graminea* L. – ptačinec trávovitý

Popis:

Vytrvalá, řídkce trsnatá, trávovitě až sytě zelená bylina s tenkým plazivým, větveným oddenkem. Lodyhy jsou 10-90 cm vysoké, jednoduché nebo větvené, čtyřhranné, lysé, často s listovými svazečky nebo krátkými sterilními větévkami v listových úžlabích. Listy jsou kopinaté až čárkovitě kopinaté, na okrajích brvitou bází přisedlé, s vyniklou žilkou. Květy vyrůstají v řídkých, 15-50květvých vidlanech. Listeny, široce vejčité až vějčité kopinaté, jsou blanité, bělavé, s úzkým nahnědlým, řídkěji zelenavým středním proužkem. Dva vnější kališní lísky jsou na okrajích brvitě, korunní lístky jsou dvoudílné, zpravidla o 1/3 delší než kališní.

Výskyt:

Ptačinec obývá suché i vlhké louky, travnaté stráně a meze, pastviny, travnaté lesní okraje, okraje silnic, železniční náspy, nezřídka se nachází i v mokřinách, v terénních sníženinách nebo na místech, která jsou narušena mechanickými zásahy (16).



3.4.2.8. *Stellaria palustris* Retz. – ptačinec bahenní

Synonyma:

Stellaria graminea var. β L., *S. dilleniana* Moench, *S. palustris* Ehrh

Popis:

Tato vytrvalá bylina je zpravidla nasivěle zelená s tenkým plazivým oddenkem. Lodyhy jsou 15-45 cm vysoké, jednoduché, řidčeji větvené, jednotlivé nebo v řídkých trsech, čtyřhranné, nevýrazně rýhované a lysé. Listy jsou čárkovitě kopinaté až čárkovité, s vyniklou střední žilkou, v úžlabí často se svazečky listů nebo s krátkými sterilními větévkami. Květy jsou poměrně velké, v koncových 3-10-ti květech vidlanech, řidčeji jednotlivé nebo po dvou na lodyze. Listeny jsou vejčitě kopinaté až čárkovitě kopinaté. Kališní lístky mají často zašpicatělý tvar a čerstvé jsou zřetelně trojžilné. Korunní lístky jsou téměř dvoudílné, zpravidla zřetelně, asi o 1/2 delší než lístky kališní. Vrásčitá semena jsou 1,2-1,7 mm široká, tmavě kaštanově hnědá (16). Kvete od dubna do října (20).

Výskyt:

Ptačinec bahenní se nachází na stinných loukách a slatiništích, v rákosinách a mokřinách, na okrajích zarůstajících říčních ramen a tůních (16).



3.5. Obsahové látky

Ve *Stellaria media* (L.) Vill. se vyskytuje velké množství látek. V posledních letech jsou intenzivně zkoumány a jejich přehled je v tab. č. 3.

Tab. č. 3: Obsahové látky v nati *S. media* (L.) Vill.

Látky	Citace
Karotenoidy - β -karotenoid	18 / 21 / 22
Glykosidy	18
Slizy	18
Třísloviny	18 / 21 / 22
Alkalické soli	21
Glykosidický saponin	21
Flavonoidní C-glykosidy - α -spinasterol, stigmasterol	22
vitamin C, E, K	22
Volné vyšší alkoholy a kyseliny	22
Aminokyseliny - sacharopin (degradační produkt lysinu), 2-aminoadipová kys. (taurin)	22
Fytosteroly	22
Estery – hentriacontanol, cerylcerotát	23
Vyšší mastné kyseliny – oktadekatetraenová, γ -linolenová	21 / 23
Rutin	23

Nutriční hodnotu 100 g čerstvé nati uvádí J.A. Duke (23), přehled je uveden v tab. č. 4.

Tab. č. 4: Množství látek významných z hlediska výživy v různých částech nati

Látky	Nať	Semena	Listy
voda	91,7 g		
proteiny	1,2 g	18 %	
lipidy	0,2 g		
cukry	5,3 g		
vláknina	1,7 g		
popel	1,6 g		
thiamin, B ₁	0,02 mg		
riboflavin B ₂	0,14 mg		
niacin, kyselina nikotinová	0,51 mg		
kyselina askorbová	375 mg	0,15 – 0,55 %	0,1 – 0,15 %
oleje		4,8 – 5,9 %	

Kyselina askorbová

V jihovýchodní části Španělska bylo zjišťováno množství kyseliny askorbové a dehydroaskorbové, kyseliny šťavelové a dusičnanů v rostlině. Obsah látek uvádí tab. č. 5.

Byl zjišťován výskyt kyseliny erukové, která ale identifikována nebyla.

Kyselina askorbová a dehydroaskorbová byly stanoveny po reakci s 2,4-dinitrofenylhydrazinem spektrofotometrickým měřením (24).

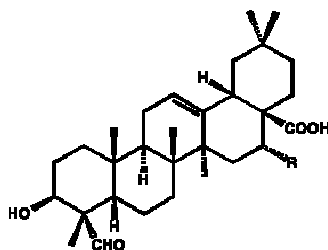
Tab. č. 5: Obsah kyseliny askorbové, kyseliny šťavelové a dusičnanů ve *Stellaria media* (L.) Vill.

Čerstvá nať		mg / 100 g natí
	Kyselina askorbová	73 mg
	Kyselina dehydroaskorbová	16 mg
Listy		
	Voda	93,65 ± 2,81 g
	Kyselina askorbová	29 ± 8 mg
	Kyselina dehydroaskorbová	9 ± 3 mg
	Kyselina šťavelová	370 ± 55 mg
	Dusičnany	103 ± 14 mg

T. M. Zennie a C. D. Ogzewalla zjišťovali obsah kyseliny askorbové a vitamínu A ve *Stellaria media* (L.) Vill. rostoucí v Ohio a Kentucky. Ve 100 g natí bylo obsaženo 49 mg kyseliny askorbové, zatímco vitamin A se v rostlině nevyskytoval (25).

Triterpenické saponiny:

Analýze saponinů se věnovala práce rumunských autorů. Bylo zjištěno, že obsah saponinů v droze je 4,50/100 g sušiny a obsah saponinů v extraktu 3,80 %. Hlavní aglykon byl identifikován jako gypsogenin. Triterpenické saponiny v koncentraci 5 % však neprojevovaly hemolytickou aktivitu (22, 26).



gypsogenin

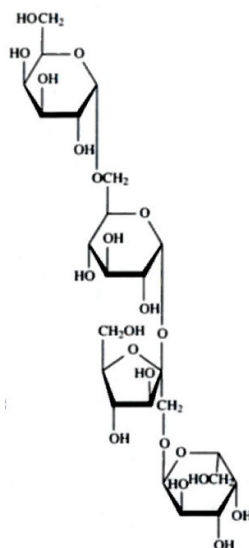
Sacharidy:

Ze *Stellaria media* byl izolován tetrasacharid lychnosa (α -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fru-(1 \rightarrow 1)- α -D-Gal). Tento sacharid se vyskytuje spolu s isolychnosou (α -D-Gal-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fru-(1 \rightarrow 3)- α -D-Gal) pouze v zástupcích čeledi *Caryophyllaceae* a v rostlině se nachází ve všech vegetativních částech kromě semen. Ostatní rostlinné druhy v rámci *Caryophyllales* obsahují ve vegetativních částech pouze klasické oligosacharidy ze skupiny rafinos. Mezi nejrozšířenější cukry v čeledi *Caryophyllaceae* patří sacharosa, raffinosa a lychnosa. Podíl isolychnosy je v porovnání s lychnosou pouze 5-10 %.

Není jasné, zda je lychnosa zásobním cukrem, ale jsou zde náznaky, že hromadění lychnosy je spojeno s odolností vůči mrazu. Protože *Stellaria media* (L.) Vill. obsahuje vysoký podíl lychnosy (20 mg/g), může být nalezena na otevřených polích po celý rok. Hromadění lychnosy v rostlině probíhá během zimního období, kdy byla zjištěna její největší koncentrace, a to více než 42 mg/g.

O biosyntéze lychnosy a isolychnosy není zatím mnoho známo.

Lychnosa je ve vodě rozpustný, neredukující tetrasacharid, prvně izolován z větvi *Silene dioica* (L.) (27).



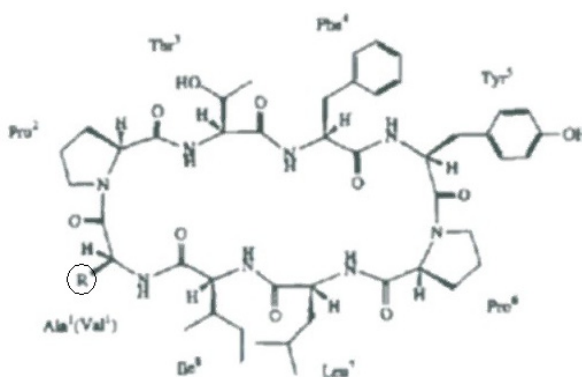
Lychnosa

Peptidy

Z kořenů *Stellaria dichotoma* L. byly izolovány dva nové cyklické oktapeptidy. Prvním byl dichotomin H, cyklo(-Ala-Pro-Thr-Phe-Tyr-Pro-Leu-Ile-) a druhým dichotomin I, cyklo(-Val-Pro-Thr-Phe-Tyr-Pro-Leu-Ile-) (28).

Ve *Stellaria yunnanensis* Franch byly identifikovány cyklické heptapeptidy cyklo-(Gly-Tyr-Gly-Gly-Pro-Phe-Pro) a cyklo-(Gly-Ile-Pro-Tyr-Ile-Ala-Ala) (29).

Cyklické peptidy jsou zajímavé přírodní produkty projevující se rozsáhlou řadou biologických aktivit. Dichotominy mají cytotoxickou aktivitu a působí inhibiči cyklooxygenázy *Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bunge, která byla používána v tradiční medicíně na léčbu horečky (28).



Dichotomin H (R = CH₃) a **I** (R = isopropyl)

Glykosidy

Ve *Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* byly objeveny nové struktury glykosidů: glykosidní alkaloid β -karbolinového typu glukodichtomin B, 4 neolignanové glykosidy dichotomosidy A, B, C, D a nový fenylpropanový glykosid – dichotomosid E.

Dichotomosid D inhiboval uvolnění β -hexoamidasy při koncentraci IC₅₀ 64 μ M, stejně jako α -faktor nekrózy tumoru a interkeukinu-4 při koncentraci IC₅₀ 16,34 μ M v RBL-2H3 buňkách. Tyto studie předpokládají, že dichotomin D je nejefektivnější u pozdní fáze reakcí alergie I.typu (30).

Lipidy a vyšší mastné kyseliny

Z rostliny bylo izolováno velké množství lipidů. Mezi nimi je zajímavá γ -linolenová kyselina (GLA) (31). Za tímto účelem byla studována semena zástupců z čeledi *Caryophyllaceae* (podčeleď *Alsinoideae*, *Silenoideae* a *Spergulaceae*). Významné byly pouze ty, kde se vyskytoval nízký podíl rušivých látek a byly tedy vhodné pro získání čisté GLA. Největší množství GLA bylo nalezeno hlavně v čeledi *Alsinoideae*. V této čeledi bylo také přítomno rozdílné množství kyseliny stearidonové, a to v rozsahu od nedetekovatelného množství až po 3,30 % z celkových mastných kyselin ve *Stellaria media* (L.) Vill. (32).

V mladých listech *Stellaria media* (L.) Vill. rostoucí v Austrálii byla dominantní mastnou kyselinou α -linolenová kyselina. Dlouhé řetězce ω -3-nenasycené mastné kyseliny jako kyselina eikosapentoová, dokosaheptaenová ani dokosapentoová rostlina neobsahovala. α -linolenová kyselina se převážně vyskytuje v tkáních rostlin. Patří mezi Ω -3 nenasycené mastné kyseliny, protože ji lidský organismus nemůže sám syntetizovat. Proto je velmi důležité, aby tato kyselina byla přijímána z potravy. Ω -3 nenasycené mastné kyseliny hrají důležitou roli v kardiovaskulárním systému a modelují lidský metabolismus v těle a jeho vývoj. Bylo zjištěno, že ve 100 g čerstvé nati *Stellaria media* (L.) Vill. se vyskytuje $113 \pm 5,8$ mg α -linolenové kyseliny, což představuje 53,8 % všech mastných kyselin v této rostlině (33).

Z dalších lipidů jsou přítomny: hentriacontan, hexacosanyl palmitát, methylstearát, pentacosanol, triacontanol, triacontanová kyselina, β -sitosterol a jeho β -D-glucosid. Dále byly ze *Stellaria media* (L.) Vill. izolovány tři nové sloučeniny. Byly identifikovány jako 6,7-dimethylheptacosan, 3-methyl-6-hydroxyheneicos-3-enyl acetát a 5-acetoxidotetracont-3-en-1-ol. Triacontanol je zajímavá protipožeravá látka proti květopasi bavlníkovému, proti *Spodoptera litura* a *Spilosoma obliqua*. *Spilosoma obliqua*, přástevník březový je poměrně hojně rozšířen i u nás. *Spodoptera litura* je můra, které se dříve říkalo blýskavka. β -sitosterol- β -D-glucosid a hentriacontan mají protizánětlivé účinky (15).

Karotenoidy

Ve 100 g nati bylo nalezeno $4,2 \pm 0,8$ mg karotenoidů. Byly stanoveny spektrofotometricky (21, 24).

Alkoholy

Pozoruhodný makrocyclický diol, mediaglykol, byl identifikován jako 1-(1,2-dihydroxyethyl)-1-isopropylcyklononadekan ve *Stellaria media* (L.) Vill. (34).

Fenolické kyseliny, flavonoidy

Ze *Stellaria media* (L.) Vill. byly izolované tyto fenolické kyseliny: p-hydroxybenzoová kyselina, kyselina vanilinová, hydroxybenzoová kyselina, ferulová kyselina, kyselina kávová, kyselina chlorogenová. Z flavonoidů byly identifikovány luteolin, apigenin, genistein.

Genistein je první isoflavonoid, který byl nalezen ve zkoumané rostlině. Flavonoid vicenin-2 byl izolován pouze ze *Stellaria holostea* L. (22).

Flavonoidy apigenin 6-C- β -D-galaktopyranosyl-8-C- α -L-arabinosa, apigenin 6-C- α -L-arabinopyranosyl-8-C- β -D-galaktopyranosa, apigenin 6-C- β -D-galaktopyranosyl-8-C- β -L-arabinopyranosa, apigenin 6-C- β -D-glukopyranosyl-8-C- β -D-galaktopyranosa, apigenin 6,8-di-C- α -L-arabinopyranosa byly poprvé objeveny v rodu *Stellaria* L. Studie potvrdily výskyt i ve *Stellaria media* (L.) Vill. (35).

Antibakteriální aktivita ptačince

Ve Skotsku byl proveden screening semen druhu *Stellaria holostea* L.. Methanolový extrakt byl vystaven působení 11 patogenních bakteriálních druhům. Extrakt vykazoval antibakteriální aktivitu pouze proti *Pseudomonas aeruginosa*, MIC – 0,10 mg/ml (36).

Testování herbicidů

Hledání herbicidů působících na *Stellaria media* (L.) Vill. se zdá být celosvětovým problémem, rostlina byla vůči nim dlouho považována za tolerantní.

Herbicidní efekt na *Stellaria media* (L.) Vill. byl testován také u triclopyru (3,5,6-trichloro-2-pyridinyloxyacetic acid), což jsou ethylenglykolbutylether a 2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-methyl (solketal) estery. Avšak nebyla nalezena žádná aktivita herbicidu proti tomuto úpornému plevelu. Hydrolyza obou esterů byla po 3 dnech z 94% kompletní a jako hlavní metabolický produkt byl identifikovaný triclopyr aspartat kombinovaný s dimethyl esterem (37).

1,3-dichlorpropan a chloropikrin patří mezi další sloučeniny, které byly použity na studie. Herbicidy účinkovaly 24h, v písčité půdě při 20°C. Bylo zjištěno, že látky jsou účinné v koncentraci 780 μ mol/kg půdy, což odpovídá hodnotám LC₉₀ (38).

Po objevení rezistence ptačince proti chlorsulfuronu v roce 1995 na Novém Zélandu byly provedeny studie velkého množství herbicidů proti ptačinci na polích a ve sklenících. Růstové populace byly kontrolovány látkami bromoxynyl + ioxynyl, diflufenikan + isoproturon a diflufenikan + bromoxynyl na polích. Byla zjištěna jak zkřížená rezistence (u rostlin, u níž byla rezistence vůči jednomu herbicidu, jsou rezistentní vůči dalším herbicidům se stejným nebo podobným mechanismem účinku), tak i multi-rezistence (rostlina je odolná vůči herbicidům, které mají rozdílné mechanismy účinku) (39). Účinek jednotlivých herbicidů uvádí tab. č. 6.

Další výzkumy sledovaly působení mecopropu (phenoxy derivátu s hormonálním účinkem) (40) a herbicidu typu difenyletheru - oxyfluorofenu (2-chloro-4-

trifluoromethylphenyl 3-ethoxy-4-nitrophenyl ether) (14) proti *Stellaria media* (L.) Vill. Opět byla zjištěna rezistence proti těmto herbicidům.

Při hledání způsobů, jak se vypořádat se zaplevelením kulturních rostlin byla zkoušena i účinnost laseru jako alternativa herbicidů. Sledovala se účinnost laseru na apikální meristem. V závislosti na vlnové délce, energii laserových paprsků, expozici a velikosti ozářené plochy byla u různých plevelů (mezi nimi i *Stellaria media* (L.) Vill.) zaznamenána redukce růstu nebo dokonce i likvidace testovaných rostlin. Mechanismem působení byl účinek zvyšující se teplota vody v rostlinných buňkách (41).

Tab. č. 6: Účinek herbicidů na ptačinec:

Herbicidy	% úhynu ptačince na polích	počet rostlin rostoucích přes působení herbicidů ve sklenicích žijící – uhynulé
chlorsulfuron	0	2 – 0
thifensulfuron	22	1 – 0
Tribenuron	20	6 – 0
bromoxynil + ioxynil	28	0 – 8
diflufenikan + isoproturon	27	0 – 6
diflufenikan + bromoxynil	17	0 – 6
mecoprop	42	-
methabenzthiazuron	11	0 – 11
metribuzin	100	-
diuron	99	-
terbuthylazin	100	-
pendimethalin	2	0 – 3
fluoroxypyr	100	-

3.6. Účinky a použití

3.6.1. Terapeutické využití

Stellaria L., jejíž mladé výhonky se mohou sbírat prakticky po celý rok, se odedávna používá v lidovém léčitelství hlavně jako posilující prostředek pro rekonvalescenty, při tuberkulóze (18), elefantiáze a rúži (23).

Rostlina byla středověkými herbáři doporučována proti suchotinám (úbytím) a podle autora Fiecka byly četné pokusy s úspěšným použitím při lékařsky zjištěné plicní tuberkulóze. Při onemocnění plic se používaly 2-3 čajové lžičky jako studený nebo horký nálev (42).

V různých zemích se doporučovala jako diuretikum, galaktogogum, laxativum, jako kardioaktivní a protizánětlivý prostředek proti katarům respiračního a močového ústrojí (22).

Ptačinec byl lidovým lékem při kašli, chrapotu, astmatu, krevních poruchách, rakovině, vředech, dyspepsii, hemeroidech, spasmech, horečce, frakturách, vzteklině, infekci, zánětu, otoků, obezitě, zánětu spojivek a urogenitálních onemocněních. Bylina se také používala na léčbu pohmožděnin, patřila mezi látky tišící bolest, působící chladivě a užívala se také při menstruačních potížích (vyvolávala a upravovala menstruaci) (23, 36).

Také se používala jako adstringens, karminativum, obklady se přikládaly na místa, kde se vyskytovaly křehké povrchové žilky (43).

Odvarem se léčila zácpa a v masti se aplikoval na lupenku a ekzémy (18).

V Číně se používal ve formě infúze při krvácení z nosu.

Čerstvá rozdrcená bylina se používala zevně na ošetření zranění nebo při revmatismu, dermatitidách a dalších jiných onemocněních kůže (22). Často byla využívána homeopaty (23).

V kosmetice se šťáva ze *Stellaria L.* aplikovala na různé defekty v obličeji, avšak kosmetici jsou skeptičtí, zda je bylina zdraví prospěšná (23). Ale jsou i zprávy, že v některých zemích, jako např. v Bulharsku se tato bylina v kosmetice používá (22).

Vysoké dávky ptačince mohou způsobovat průjem a zvracení a není doporučována u těhotných žen (43).

3.6.2. Ostatní využití

Stellaria L. často sloužila jako krmivo pro dobytek, ale při nadměrné konzumaci může způsobovat u ovcí trávicí potíže (23). U krav údajně podporuje laktaci (18).

Pro ptáky jsou velkou pochoutkou jak zelené části rostliny, tak i semena (23). Hlavně v zimním období je potravou ptáků žijících ve volné přírodě, např. strnada červeného (*Emberiza schoeniclus*) (44).

Nektar z květů *Stellaria media* (L.) Vill. slouží jako jarní potrava pro včely a mouchy, protože v 1 květu je obsaženo 7 až 38 mg cukru (45).

Ve střední Itálii se *Stellaria media* (L.) Vill. tradičně používá jako krmivo pro ptáky a ovce. Rostlina s lidovým označením „slepičí oko“ ("occhio pulcino") je součástí potravy pro slepice a kuřata, které údajně díky ní snášejí více vajec s jasně červeným zbarveným žloutkem (21).

Ptačinec však není potravou pouze pro zvířata, často jej můžeme najít i v kuchařských receptech. Jedlou částí je mladá křehká nať s listy, vhodná do salátů, do polévek, nádivek, pomazánek, do špenátu apod. (18).

4. Experimentální část

4.1. Rostlinný materiál

Nat' *Stellaria media* (L.) Vill. jsem nasbírala na záhonech a ve skleníku na Zahradě léčivých rostlin farmaceutické fakulty. Po sklizni byla nat' zbavena zbytků písku a zeminy a usušena volně na vzduchu. Pro analýzu byla upráškována na síto č 355.

4.2. Přístroje

Analytické váhy KERN

Laboratorní váhy KERN

Ultrazvuková lázeň Bendelin Sonorex

Mikrodávkoč BIOHIT

Dvoupaprskový UV-VIS Spektrofotometr UV 1601 Shimadzu

Lyofilizátor MLW – LGA 05, Medizintechnik Leipzig, GDR

Chromatografická sestava Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), předkolonový filtr a kolona

LiChrospher RP-18 250x4 (5mm) s ochranou předkolkou.

Rotační vakuová odparka Laborta

Horkovzdušná sušárna BINDER

Centrifuga MPW 342

UV lampa – CAMAG

Třepačka LT2

Muflová pec – LP

Digitální mikroskop Olympus XB

Digitální fotoaparát Olympus

4.3. Chemikálie

5 – methylnfenazinum – methyl – sulfát Sigma

Aceton p.a.

Acetonitril Fisher Scientific

β – nikotinamid adenin dinukleotid Sigma

Difenylboryloxyethylamin C. roth, SRN

DPPH - 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl Sigma

EDTA disodná sůl, p.a. Lachema

Ethanol p.a.

Chloroform p.a.

Kyselina askorbová p.a.

Kyselina fosforečná p.a.

Kyselina chlorovodíková p.a.

Kyselina mravenčí bezvodá p.a.

Kyselina octová ledová p.a.

Kyselina sírová p.a.

Kyselina šťavelová p.a.

Ether p.a.	Methanol p.a.
Ethylacetát p.a.	Methenamin p.a. Penta
Hydrogenfosforečnan draselný p.a.	Methylviologen
Hydroxid draselný p.a.	Nitrotetrazolinová modř Sigma
Hydroxid sodný p.a.	Petrolether p.a.
Chloralhydrát 99% Aldrich	Síran sodný bezvodý p.a.
Chlorid hlinitý p.a.	Vanilin

Chlorid hlinitý RS1:

2,0 g hexahydrátu chloridu hlinitého jsem rozpustila ve 100 ml roztoku kyseliny octové ledové R 5% v/v.

Kyselina chlorovodíková RS:

70 g kyseliny chlorovodíkové R jsem zředila vodou R na 100,0 ml.

4.4. Farmakognostické hodnocení

4.4.1. Mikroskopie

Materiál byl projasněn zahříváním v roztoku chloralhydrátu a obvyklým způsobem byl připraven mikroskopický materiál.

Preparáty jsem pozorovala pod mikroskopem Olympus XB a charakteristické znaky byly zachyceny digitálním fotoaparátem. Výsledky uvádí obr. 1 – 9.

4.4.2. Tenkovrstevná chromatografie

4.4.2.1. Důkaz flavonoidů

Zkoušený roztok. 2,0 g práškované drogy jsem extrahovala na ultrazvukové lázni 30 minut s 50 ml methanolu. Výluh jsem zfiltrovala a doplnila na původní objem.

Stacionární fáze. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC bez indikátoru.

Mobilní fáze. Směs etylacetátu, kyseliny octové, kyseliny mravenčí bezvodé a vody v poměru 100:11:11:27.

Nanášení. 10 µl do proužků.

Vyvíjení. Po dráze 10 cm.

Detekce. Desku jsem postříkala roztokem difenylboryloxyethylaminu (10 g/l) v methanolu a poté jsem ji nechala krátce sušit při 100 – 105°C. Flavonoidy jsem pozorovala pod UV lampou při vlnové délce 365 nm.

Výsledky jsou na obr. č.10.

4.4.2.2. Důkaz saponinů (46)

Zkoušený roztok. 2,0 g upráškované drogy jsem vařila 10 minut pod zpětným chladičem s 50 ml 70% ethanolu. Výluh drogy jsem zfiltrovala a doplnila na původní objem. Extrakt jsem 10x zředila.

Stacionární fáze. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC bez indikátoru.

Mobilní fáze. Směs chloroformu, methanolu a vody v poměru 65:35:10.

Nanášení. 10 µl do proužků.

Vyvíjení. Po dráze 10 cm.

Detekce. Desku jsem postříkala nejdříve 1% ethanolovým roztokem kyseliny sírové, nechala ji uschnout a poté jsem ji postříkala 5% ethanolovým roztokem vanilinu.

Chromatografickou desku jsem sušila velmi krátce při teplotě 100 – 105°C.

Hodnocení je na obr. č.10.

4.4.3. HPLC

4.4.3.1. Úprava vzorku

2,0 g upráškované drogy jsem smíchala s 50 ml 80% vodného roztoku methanolu a nechala 30 minut extrahovat ultrazvukem, zfiltrovala a doplnila na původní objem 50 ml. Výluh jsem odpařila na rotační vakuové odparce a z odparku jsem vymývala chlorofyl etherem. Odparek jsem částečně rozpustila za tepla v methanolu, zfiltrovala a doplnila do 25 ml methanolem.

4.4.3.2. Podmínky HPLC

HPLC analýzy byly prováděny na chromatografické sestavě Jasco (čerpadlo PU-2089, detektor MD-2015, autosampler AS-2055), vybavené předkolonovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5mm) s ochranou předkolonkou.

Nastříkovaný objem byl 20,0 µl. Od času $t = 0$ min až $t = 8$ min byl eluentem A voda s obsahem 0,15% pufru, kys.fosforečné, eluentem B acetonitril (97% eluentu A a 3% eluentu B). Eluce mobilní fáze probíhala nejdříve isokraticky a rychlost průtoku mobilní fáze byla 1ml/min. V čase $t = 8$ min do $t = 40$ min probíhala gradientově podle výše uvedených podmínek do 75% acetonitrilu a 25% vody, průtok 1,45 ml/min.

Detekce byla provedena pomocí DAD detektoru v rozmezí vlnových délek 200 - 650nm. Obsah sledovaných látek byl vypočten z píků při vlnové délce 254 nm a 320 nm. Obsah všech látek byl kvantifikován matematickou metodou normalizace a porovnáním s kalibrační křivkou vytvořenou pomocí externě měřeného standardu téže látky.

Výsledky uvádí obr. č.11 a tab. č. 7.

4.4.4. Stanovení ztráty sušením (ČL 2002)

2,000 g upráškované drogy jsem navážila do předem vysušených a vytárovaných skleněných váženek. Drogu jsem sušila 2 hodiny při 105°C v horkovzdušné sušárně, poté jsem ji převážila a vypočítal ztrátu sušením.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 8.

4.4.5. Celkový popel (ČL 2002)

Křemenný kelímek jsem žíhala 30 min do červeného žáru v muflové peci a po vychladnutí v exsikátoru zvažila. Do kelímku jsem navážila 1,000 g upráškované drogy, nechala sušit 1 h při 100 °C až 105 °C, poté jsem kelímek s vysušenou drogou žíhala do konstantní hmotnosti v muflové peci při (600 ±25) °C a nakonec opět zvažila.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 9.

4.4.6. Popel nerozpustný v kyselině chlorovodíkové (ČL 2002)

Do kelímku obsahujícího zbytek po stanovení celkového popela jsem přidala 15 ml vody R a 10 ml kyseliny chlorovodíkové R . Kelímek jsem přikryla hodinovým sklem a 10 minut jsem ho mírně zahřívala na vodní lázni. Po ochlazení jsem obsah zfiltrovala bezpopelným filtrem a zbytek promývala teplou vodou R až do neutrální reakce filtrátu. Filtrační papír byl v kelímku vysušen v horkovzdušné sušárně, poté v muflové peci spálen a po vychladnutí v exsikátoru jsem ho zvažila.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 10.

4.4.7. Stanovení extraktivních látek (ČsL 4)

5,02 g práškované drogy jsem odvážíla do baňky na 200 ml se zabroušenou zátkou a po částech jsem ji přelila vyluhovadlem, kterým bylo 50,0 g ethanolu 60% (stanovení extraktivních látek v lihu) nebo 100,0 g vařící vody (stanovení extraktivních látek ve vodě). Baňku s obsahem jsem zvažila a během 24 h občas protřepávala. Po této době jsem ji znovu zvažila a doplnila vypařené množství vyluhovadlem. Obsah jsem protřepala a rychle zfiltrovala suchým filtrem do suché baňky. Odvážíla jsem 25,00 g čirého filtrátu do vytárovaných skleněných váženek, vyluhovadlo jsem na vodní lázni nechala odpařit a odparek se poté nechal 1h sušit při 105°C. Potom jsem váženku vložila do exsikátoru a po vychladnutí zvažila.

Množství extraktivních látek v lihu v procentech (x) se vypočte ze vzorce:

$$x = \frac{100}{q} \frac{50 - m}{25 - m}$$

kde, m ...množství extraktu získaného z 25 g výluhu
qnavážka drogy v g

Výsledek je uveden v tabulce č. 11.

Množství extraktivních látek ve vodě v procentech (x) se vypočte ze vzorce:

$$x = \frac{100}{q} \frac{100 - m}{25 - 2m}$$

kde, m ...množství extraktu získaného z 25 g výluhu
qnavážka drogy v g

Výsledek je uveden v tabulce č. 12.

4.4.8. Stanovení obsahu flavonoidů

Stanovení bylo provedeno postupem dle článku *Betulae folium* v ČL 2002.

Základní roztok: 0,200 g práškové drogy jsem ve 100 ml baňce smíchala s 1,0 ml roztoku methenaminu R (5 g/l), 20 ml acetonu R a 2,0 ml kyseliny chlorovodíkové RS (250 g/l) a směs jsem nechala 30 minut vařit pod zpětným chladičem. Poté jsem extrakt zfiltrovala přes chomáček vaty do 100 ml odměrné baňky. Drogu i chomáček vaty jsem povařila ještě dvakrát po dobu 10-ti minut pod zpětným chladičem s 20 ml acetonu R. Po ochlazení jsem směs zfiltrovala filtračním papírem do téže odměrné baňky. Roztok v odměrné baňce jsem zředila acetonem R předem použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml.

20,0 ml roztoku jsem převedla do dělicí nálevky, přidala jsem 20 ml vody R a protřepávala nejprve s 15 ml a pak třikrát s 10 ml ethylacetátu R. Spojené horní vrstvy jsem protřepávala dvakrát s 50 ml vody R. Vodné vrstvy jsem pokaždé odpustila a acetátové podíly jsem spojila a nakonec zfiltrovala přes 10 g síranu sodného bezvodého R do 50 ml odměrné baňky. Roztok v baňce jsem zředila ethylacetátem R na 50,0 ml.

Zkoušený roztok. 10,0 ml základního roztoku jsem smíchala s 1,0 ml roztoku chloridu hlinitého RS1 a poté zředila roztokem kyseliny octové ledové R 5% v/v v methanolu R na 25,0 ml.

Kontrolní roztok. 10,0 ml základního roztoku jsem zředila roztokem kyseliny octové ledové R 5% v/v v methanolu R na 25,0 ml.

Po 30 minutách jsem změřila absorbance zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$) jsem vypočítala podle vzorce:

$$\frac{A \cdot 1,25}{m} \quad \text{kde, } A = \text{absorbance roztoku při 425 nm}$$

m = hmotnost drogy v g

Výsledky uvádí tabulka č.13.

4.4.9. Stanovení obsahu kyseliny askorbové (47)

4.4.9.1. Příprava činidel a standardu

0,1% vodný roztok methylviologenu

Pro přípravu 150 ml vodného roztoku jsem použila 0,15306 g 98 % methylviologenu.

2 mol/l vodný roztok hydroxidu sodného

Ve 200ml deionizované vody jsem rozpustila 16 g NaOH.

0,2 mol/l vodný roztok kyseliny šťavelové

12,607 g kyseliny šťavelové dihydrátu jsem rozpustila v 500 ml deionizované vody.

5% vodný roztok EDTA disodná sůl

5,0 g EDTA disodné soli jsem rozpustila ve 100 ml deionizované vody.

Kyselina askorbová 1 mg/ml

100 mg kyseliny askorbové jsem rozpustila ve 100 ml deionizované vody.

4.4.9.2. Kalibrační graf

Nejdříve jsem změřila absorbanci a následně sestrojila kalibrační křivku standardu kyseliny askorbové při vlnové délce 600 nm.

Do řady zkumavek jsem odpipetovala objem od 0,3 ml do 1,0 ml roztoku kyseliny askorbové (1mg/ml). Pokaždé byl objem doplněn do 1,0 ml deionizovanou vodou.

Následně jsem přidala 2,0 ml 0,1% methylviologenu a 2,0 ml

2 mol/l NaOH. Zkumavky jsem zlehka promíchala a nechala 2 minuty stát. Po 2 minutách jsem změřila absorbanci, proti slepému vzorku, který obsahoval 2,0 ml

0,1% methylviologenu, 2,0 ml 2 mol/l NaOH a 1,0 ml deionizované vody. Měření jsem provedla pro každou koncentraci vždy 2x.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.14 a grafu č.1.

4.4.9.3. Příprava extraktu z čerstvé nati *Stellaria media* (L.) Vill

Rozmixovala jsem 20 g čerstvé nati, ke které jsem přidala 100 ml 0,2M kyseliny šťavelové a dále, v co nejkratší možné době, 1,0 ml 5% vodného roztoku EDTA. Tento extrakt jsem zfiltrovala a zcentrifugovala (5 min, 1850 ot.).

4.4.9.4. Příprava extraktu z drogy *Stellaria media* (L.) Vill

1 g drogy jsem rozmixovala s 10 ml vodného roztoku 0,2M kyseliny šťavelové. Poté jsem přidala, co nejrychleji, 0,1 ml EDTA a extrakt zfiltrovala, doplnila na původní objem a centrifugovala (5 min, 1850 ot.)

4.4.9.5. Vlastní stanovení kyseliny askorbové

Jednotlivě do zkumavek jsem odměřila 1,0 ml extraktu z čerstvé nati nebo z drogy. Přidala jsem 2,0 ml 0,1% methylviologenu, 2,0 ml 2 mol/l NaOH a zkumavky jsem lehce promíchala. Po 2 minutách jsem změřila absorbanci při λ 600 nm proti slepému vzorku, který byl tvořen: 2,0 ml 0,1% methylviologenu, 2,0 ml 2 mol/l NaOH a 1,0 ml deionizované vody. Měření bylo provedeno 3x.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.15, 16.

4.5. Antiradikálová aktivita

4.5.1. Testování antiradikálové aktivity s DPPH

4.5.1.1. Příprava základního roztoku DPPH

0,05g DPPH (2,2-difeny-1-pikrylhydrazyl) 90% jsem rozpustila do 25,0 ml methanolu a pro úplné rozpuštění jsem roztok nechala 5 minut v ultrazvukové lázni. Po ochlazení jsem doplnila objem do 25,0 ml methanolem. Takto připravený roztok jsem uchovávala v lednici.

V každém dni měření jsem změřila absorbanci (při λ = 517 nm) kontrolního vzorku proti methanolu. Kontrolní vzorek byl tvořen 0,2 ml základního roztoku DPPH a 4,8 ml methanolu. Před změřením jsem vždy vzorek nechala 30 min stát ve tmě.

4.5.1.2. Methanolvý extrakt

Methanolvý extrakt jsem připravila postupem popsáním v kapitole 4.4.2.1.

4.5.1.2.1. Postup stanovení antiradikálové aktivity I

Do 5,0 ml odměrných baněk odměřila methanolvý extrakt v množství od 0,05 do 0,6 ml, přidala 0,2 ml základního roztoku DPPH a doplnila do objemu 5 ml methanolem. Odměrné baňky jsem nechala ve tmě po dobu 30 minut.

Po uplynutí této doby jsem změřila absorbanci při vlnové délce 517 nm proti slepému vzorku – methanolu.

Z naměřených hodnot jsem vypočítala procento redukce DPPH podle vzorce:

$$\% \text{ redukce DPPH} = \left(1 - \frac{A_v}{A_k}\right) 100 \quad \text{kde, } A_v = \text{absorbance vzorku}$$

$A_k = \text{absorbance kontrolního vzorku}$

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce č.17 a grafu č. 2.

Z hodnot jsem vypočítala výběrovou směrodatou odchylku podle vztahu:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

kde, X_i = měřená hodnota
 \bar{X} = aritmetický průměr hodnot X_i
 n = počet hodnot X_i
 s = výběrová směrodatná odchylka

4.5.1.2.2. Postup stanovení antiradikálové aktivity II

Do 5,0 ml odměrných baněk jsem odměřila získaný extrakt v množství od 0,05 do 0,6 ml, přidala 0,2 ml základního roztoku DPPH a doplnila do 5 ml methanolem. Odměrné baňky jsem inkubovala při teplotě 37°C po dobu 30 minut v blokovém termostatu ISOTEMP 125D a poté jsem změřila absorbanci vzorků podle kapitoly 4.5.1.2.1.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.18 a grafu č. 3.

4.5.1.3. Methanolvý extrakt vytřepaný petroletherem

2 g práškové drogy jsem 30 minut extrahovala na ultrazvukové lázni s 50 ml methanolu. Výluh jsem zfiltrovala a doplnila na původní objem. Poté jsem extrakt třepala celkem 3x s přebytkem petroleteru. Výtřepok zbavený lipofilních látek jsem zředila do 10,0 ml methanolem.

Antiradikálovou aktivitu jsem stanovila postupem popsáním v kapitole 4.5.1.2.1.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.19 a grafu č. 4.

4.5.1.4. Vodně-methanolvý extrakt

10 g čerstvé nati jsem extrahovala s 100 ml 80% vodného roztoku methanolu 30 minut v ultrazvuku. Směs jsem poté zfiltrovala a doplnila 80% methanolem na původní objem.

Stanovení antiradikálové aktivity jsem provedla postupem dle kapitoly 4.5.1.2.1.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.20 a grafu č. 5.

4.5.1.5. Vodně-methanolvý extrakt vytřepaný petroletherem

10 g čerstvé nati jsem extrahovala se 100 ml 80% vodného roztoku methanolu 30 minut ultrazvukem. Extrakt jsem zfiltrovala, doplnila na původní objem a ve vakuové odparce jsem extrakt odpařila. Z vysušeného extraktu jsem odstraňovala chlorofyl intenzivním promýváním petroletherem a poté jsem odparek zbavený chlorofylu rozpustila pomocí ultrazvuku v 5,0 ml methanolu a ihned zfiltrovala.

Antiradikálovou aktivitu jsem stanovila podle postupu uvedeným v kapitole 4.5.1.2.1.

Výsledky uvedeny v tabulce č.21 a grafu č. 6.

4.5.1.6. Methanolvý extrakt vytřepaný chloroformem

18 g čerstvé nati jsem v Soxhletově extraktoru extrahovala 24h petroletherem, poté dalších 24h chloroformem. Z nati zbavenou lipofilních látek jsem dále pracovala. Pod zpětným chladičem jsem extrahovala 30 minut s 250 ml metanolu a poté extrakt zfiltrovala a vysušila ve vakuové odparce.

Odparek o hmotnosti 1,9 g jsem rozpustila v 5,0 ml methanolu a změřila antiradikálovou aktivitu postupem uvedeným v 4.5.1.2.1.

Výsledek je uveden v tabulce č. 22 a grafu č. 7.

4.5.1.7. Vodný výluh

4.5.1.7.1. Příprava vodného výluhu

5,0 g upráškované drogy *Stellaria media* (L.) Vill. jsem přelila 300 ml horké vody a ponechala 30 minut macerovat v kádince zakryté hodinovým sklíčkem. Poté jsem výluh zfiltrovala pomocí Büchnerovy nálevky, doplnila vodou na objem 300,0 ml, rozdělila rovnoměrně do tří Petriho misek a zmrazila v mraznici. Zmražené výluhy byly vysušeny lyofilizací.

Získala jsem 0,7789 g lyofilizátu, který jsem uchovávala v eksikátoru.

4.5.1.7.2. Příprava vzorku pro měření zhášení radikálu DPPH

0,1298 g lyofilizátu jsem s 15,5 ml methanolu extrahovala 30 minut na ultrazvukové lázni. Extrakt jsem zfiltrovala, doplnila na původní objem a vložila na 5 minut do centrifugy při 2000 ot/min. Poté jsem odměřila 12,0 ml supernatantu, se kterým jsem provedla měření antiradikálové aktivity. Objem vzorku pro stanovení byl v rozmezí 0,8 – 2,0 ml.

Antiradikálovou aktivitu jsem stanovila postupem popsáním v kapitole 4.5.1.2.1., výsledky uvádí tabulka č.23 a grafu č. 8.

4.5.2. Testování antiradikálové aktivity vůči superoxidovému radikálu

4.5.2.1. Příprava vodného výluhu drogy

Příprava vodného výluhu je popsána v kapitole 4.5.1.7.1.

Pro stanovení antiradikálové aktivity jsem připravila roztok 0,06 mg lyofilizátu ve 2,0 ml pufru KH_2PO_4 19 mM (pH 7,4) .

4.5.2.2. Příprava činidel pro stanovení antioxidační aktivity

Všechna činidla byla připravena v den měření.

Pufir KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4:

2,6 g KH_2PO_4 jsem rozpustila ve vodě a doplnila do objemu 1000,0 ml. pH 7,4 jsem upravila na pHmetru postupným přidáváním 1M roztoku hydroxidu draselného.

Roztok NADH 166 μM :

Navázila jsem 7 mg NADH do 10,0 ml kalibrované zkumavky, doplnila pufrem a nechala 10 minut v ultrazvuku. Zkumavku jsem zabalila do alobalu a dala do ledu.

Roztok NBT 43 μM (Nitrotetrazolová modř):

3,3 mg látky jsem rozpustila v 50,0 ml pufru. Roztok jsem uchovávala v alobalu obalené Erlenmayerově baňce.

Roztok PMS 2,7 μM (N-methylphenazonium methylsulfát):

Navázila jsem 0,01 g látky a rozpustila v 1,0 ml pufru. Poté jsem vypočítala, v jakém množství tohoto roztoku je obsažen 1,0 mg PMS a odpovídající objem roztoku jsem převedla do ependorfky a doplnila do 1,0 ml pufru. Z tohoto roztoku jsem poté odměřila 250 μl , převedla do alobalu obalené Erlenmayerovy baňky a doplnila do objemu 50,0 ml pufru.

4.5.2.3. Měření antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita kontrolního vzorku

Do kyvety jsem odpipetovala roztoky v následujícím pořadí:

Slepý kontrolní vzorek

150 µl roztoku pufru KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4

150 µl roztoku NADH 166 µM

450 µl roztoku NBT 43µM

150 µl roztoku pufru KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4

Kontrolní vzorek

150 µl roztoku pufru KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4

150 µl roztoku NADH 166 µM

450 µl roztoku NBT 43µM

150 µl roztoku PMS 2,7 µM

Měření jsem prováděla vždy třikrát, a to ihned po přidání pufru u slepého kontrolního vzorku a ihned po přidání PMS u kontrolního vzorku.

Absorbanci jsem změřila po 2 minutách ve dvoupráskovém spektrofotometru nastaveném na kinetickou funkci, při vlnové délce 560 nm, při pokojové teplotě.

Antioxidační aktivita vzorků *Stellaria media*

Slepý vzorek

150 µl roztoku vzorku (vodný výluh drogy)

150 µl roztoku NADH 166 µM

450 µl roztoku NBT 43µM

150 µl roztoku pufru KH_2PO_4 19 mM, pH 7,4

Vzorek

150 µl roztoku vzorku (vodný výluh z drogy)

150 µl roztoku NADH 166 µM

450 µl roztoku NBT 43µM

150 µl roztoku PMS 2,7 µM

Za stejných podmínek jsem provedla měření pro vzorek, a to vždy třikrát pro každou koncentraci.

Výsledek jsem vyjádřila v procentech inhibice redukce NBT v porovnání s kontrolním vzorkem.

Inhibici redukce NBT jsem vypočítala podle vzorce:

$$\% \text{ inhibice redukce NBT} = \left(1 - \frac{A_v}{A_k}\right) 100$$

kde:

A_v ... nárůst absorbance vzorku v čase $t = 2$ min

A_k ... nárůst absorbance kontrolního vzorku v čase $t = 2$ min

Výsledky měření antioxidační aktivity jsou uvedeny v tabulkách č. 24, 25 a grafech č. 9 a 10.

5. Výsledky

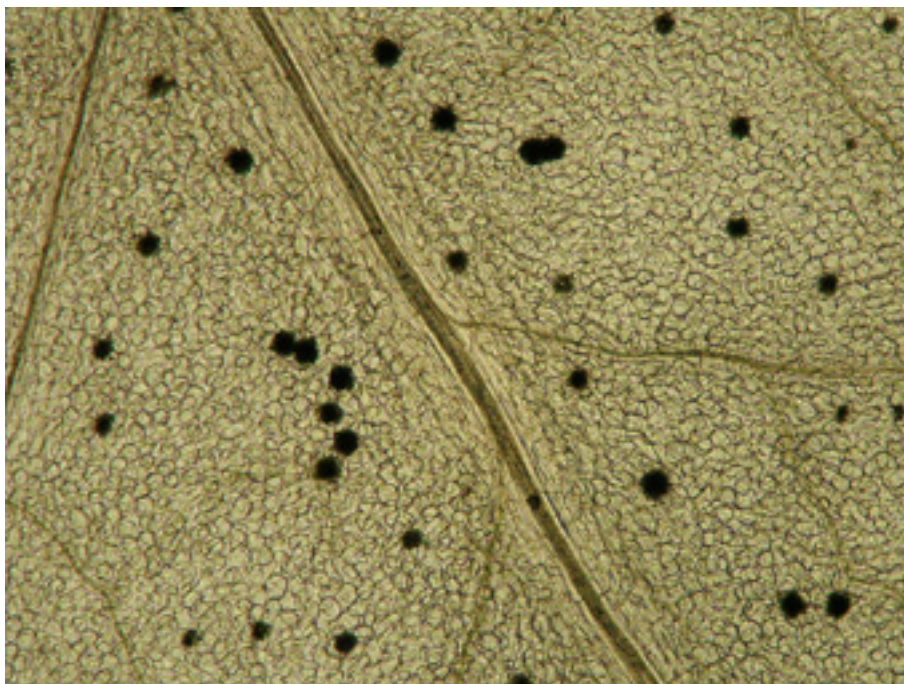
Mikroskopie

Na povrchu listu, na líci i na rubu, byly pozorovány laločnatě chobotnaté pokožkové buňky (obr. 3, 4). Jedná se o list bifaciální, jelikož palisády byly pouze pod svrchní pokožkou. Průduchy na lícové straně jsou v průměru $35,7 \pm 2,1 \mu\text{m}$ dlouhé a $21,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$ široké (obr. č. 3, 4), na rubové straně listu jsou dlouhé $42,8 \pm 4 \mu\text{m}$ a široké $30,4 \pm 2,4 \mu\text{m}$ (obr. č. 5). Uspořádání průduchů a pokožkových buněk je anisocytické.

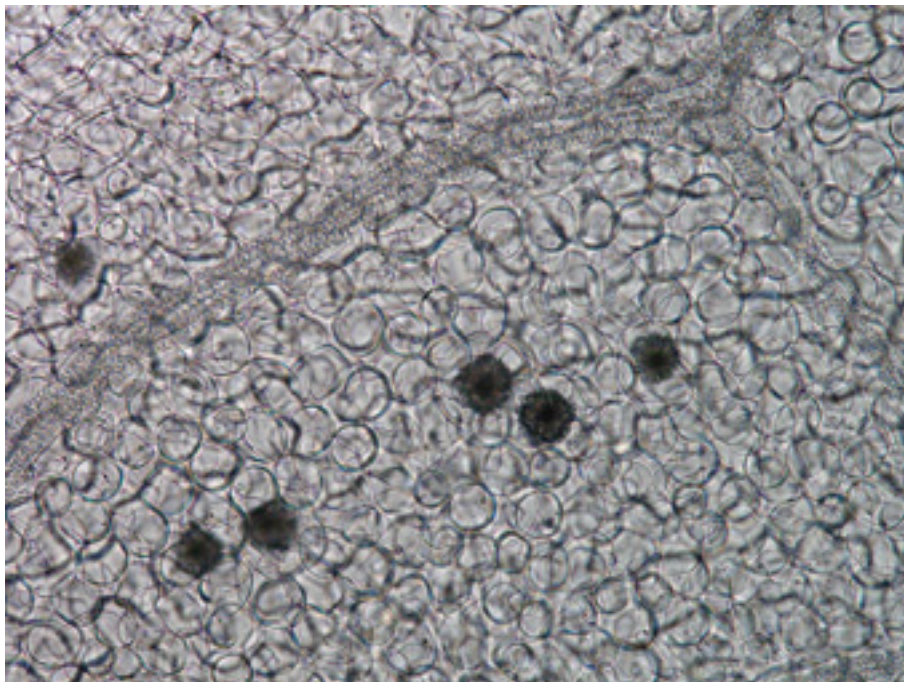
Na řapíku listu se nacházejí krycí trichomy (obr. 6), vícebuněčné (až 7 buněčné), dlouhé přibližně $1032,7 \pm 132,1 \mu\text{m}$, zašpičatělé. Žláznaté trichomy pozorovány nebyly.

Z mezofylu listu prosvítají kulovité drúzy šťavelanu vápenatého o velikosti $38 \pm 6,4 \mu\text{m}$ (obr. 7, 8, 9). Na ploše přibližně o $1500000 \mu\text{m}^2$ bylo pozorováno 18 drúz.

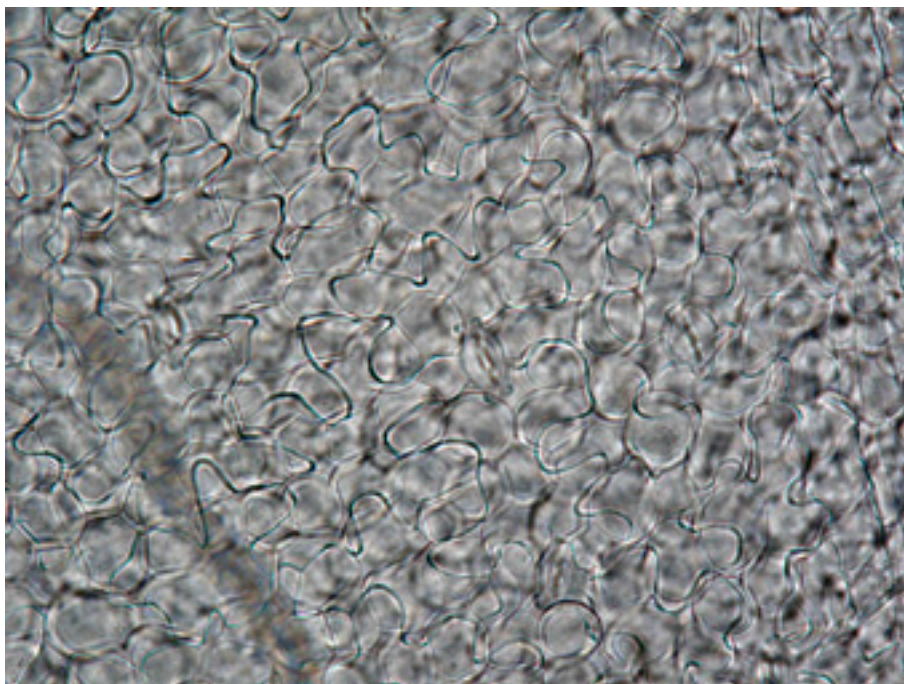
Obr. 1: Pohled na list – spodní strana, probíhající žilnatina, drúzy šťavelanu vápenatého (zvětšení 4x)



Obr. 2: Pohled na list z lícové strany - žilnatina, drúzy (zvětšení 10x)



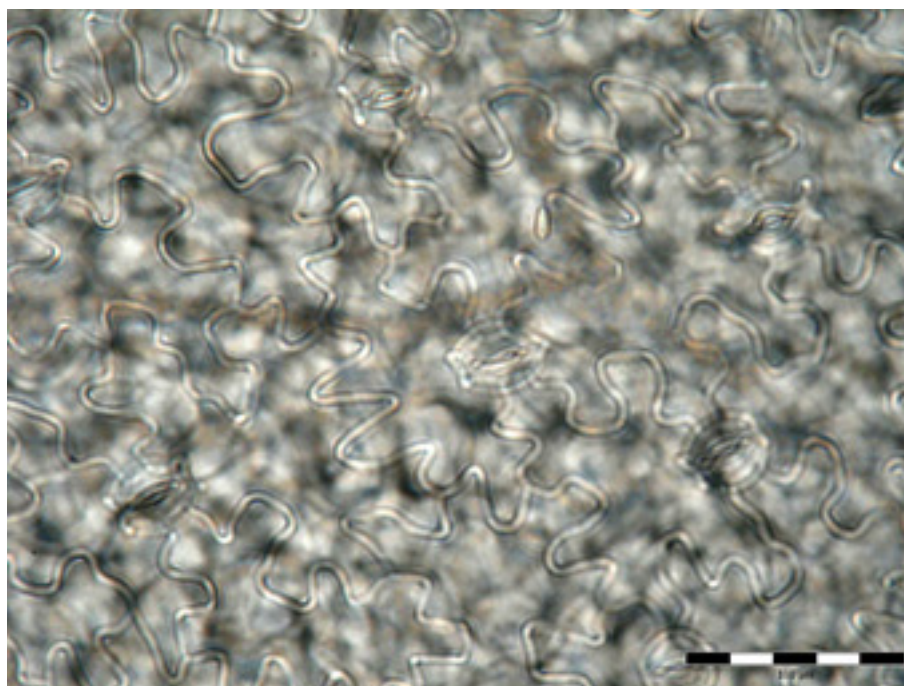
Obr. 3: Pokožkové buňky a průduchy na lícové straně (zvětšení 20x)



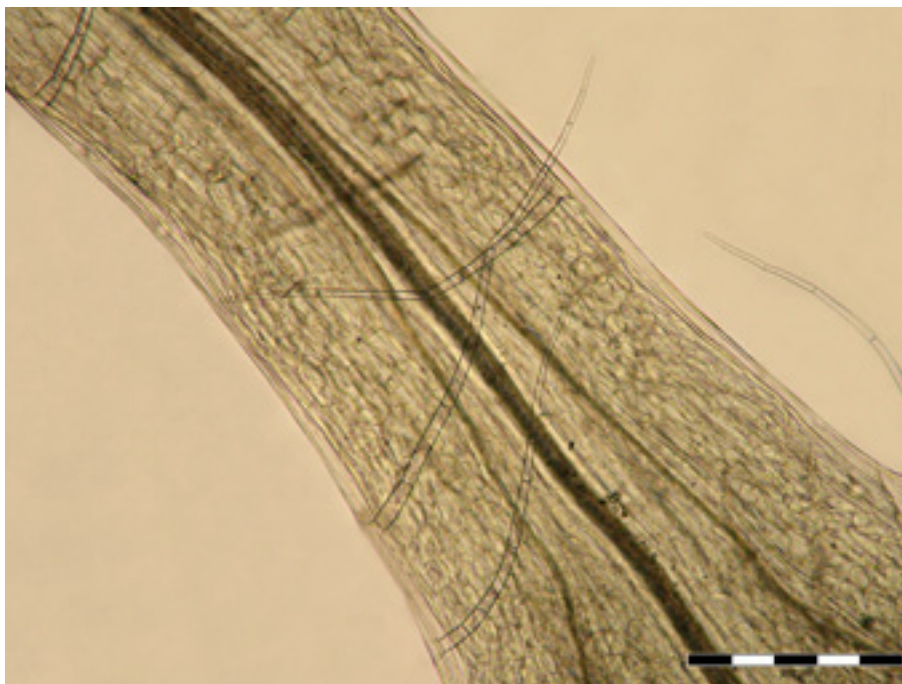
Obr. 4: Detail průduchu a pokožkových buněk na líci (zvětšení 40x)



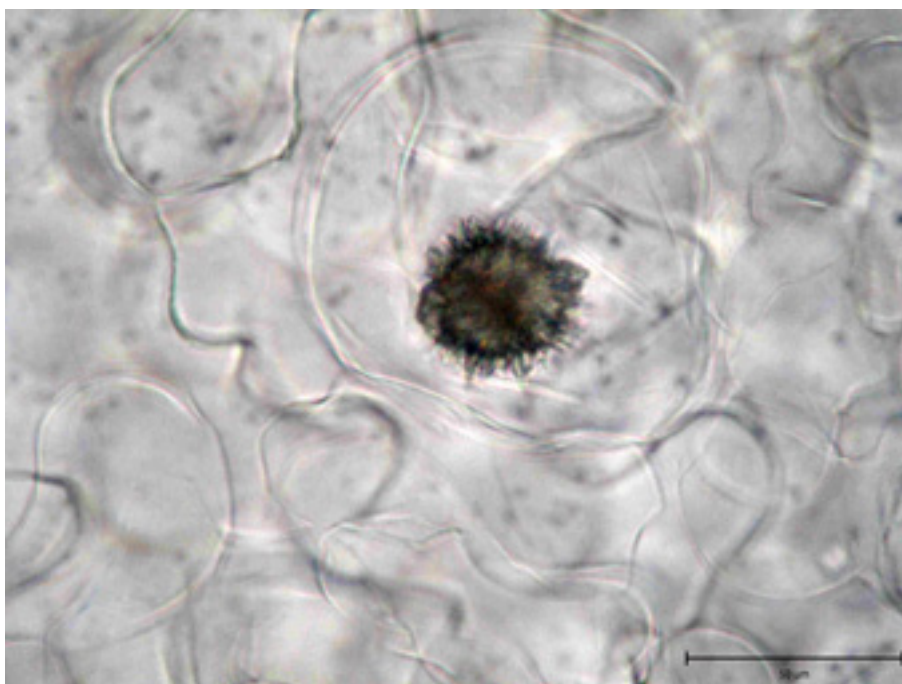
Obr. 5: Detail průduchu a pokožkových buněk na rubu (zvětšení 20x)



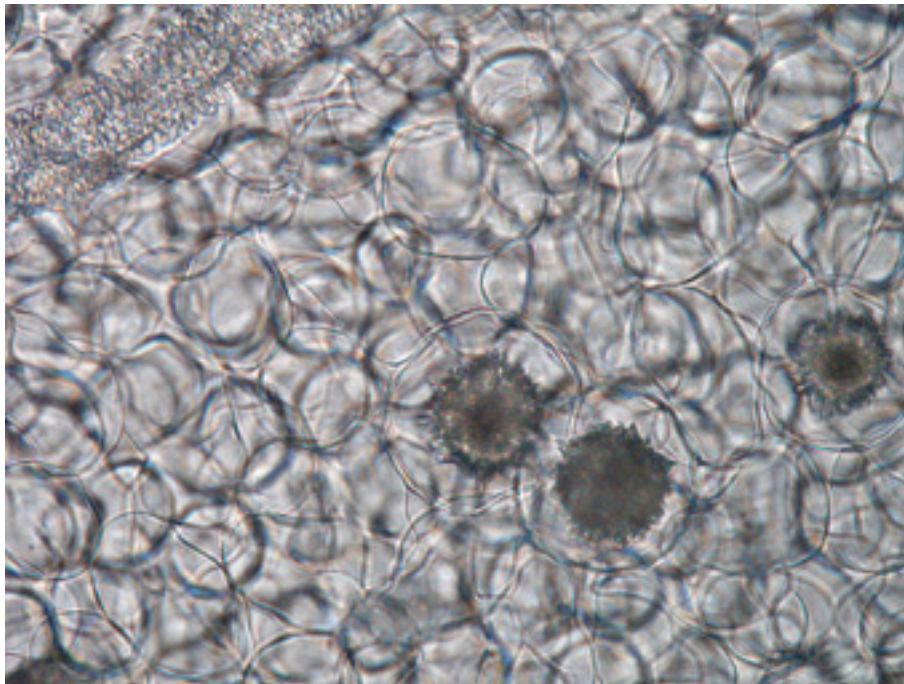
Obr. 6: Řapík listu s krycími trichomy (zvětšení 4x)



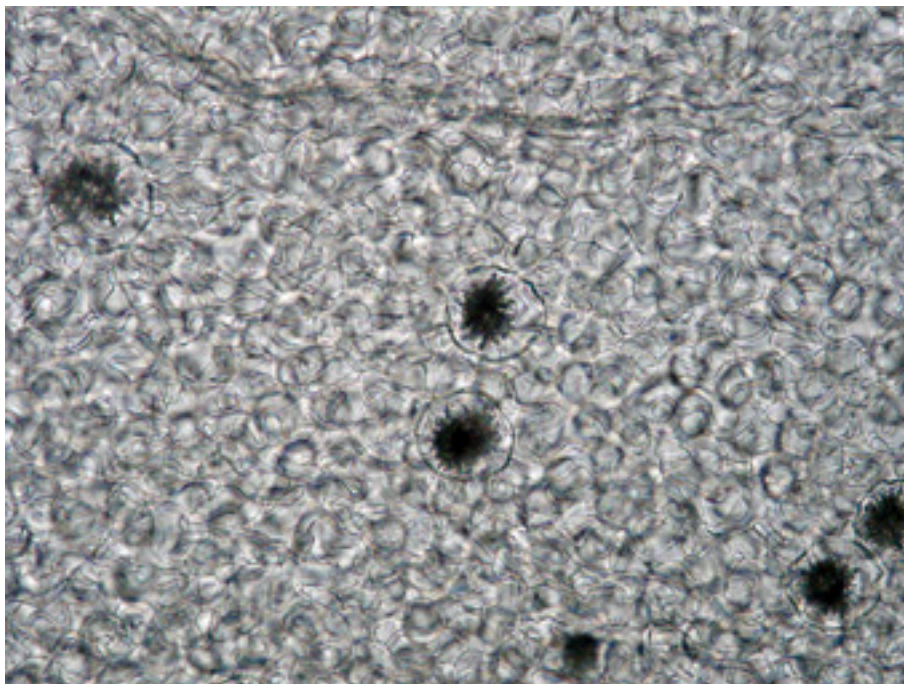
Obr. 7: Drúza šťavelanu vápenatého (zvětšení 40x)



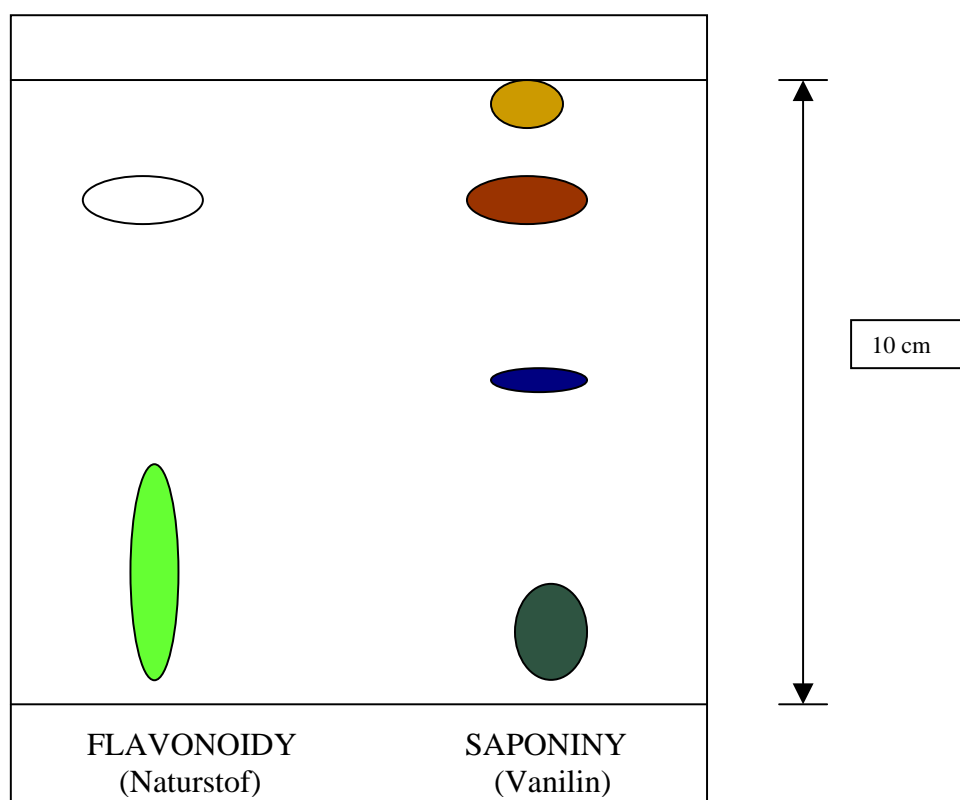
Obr. 8: Drúzy šťavelanu vápenatého, část žilnatiny a buňky palisádového parenchymu (zvětšení 20x)



Obr. 9: Pohled na drúzy v mesofylu listu (zvětšení 10x)

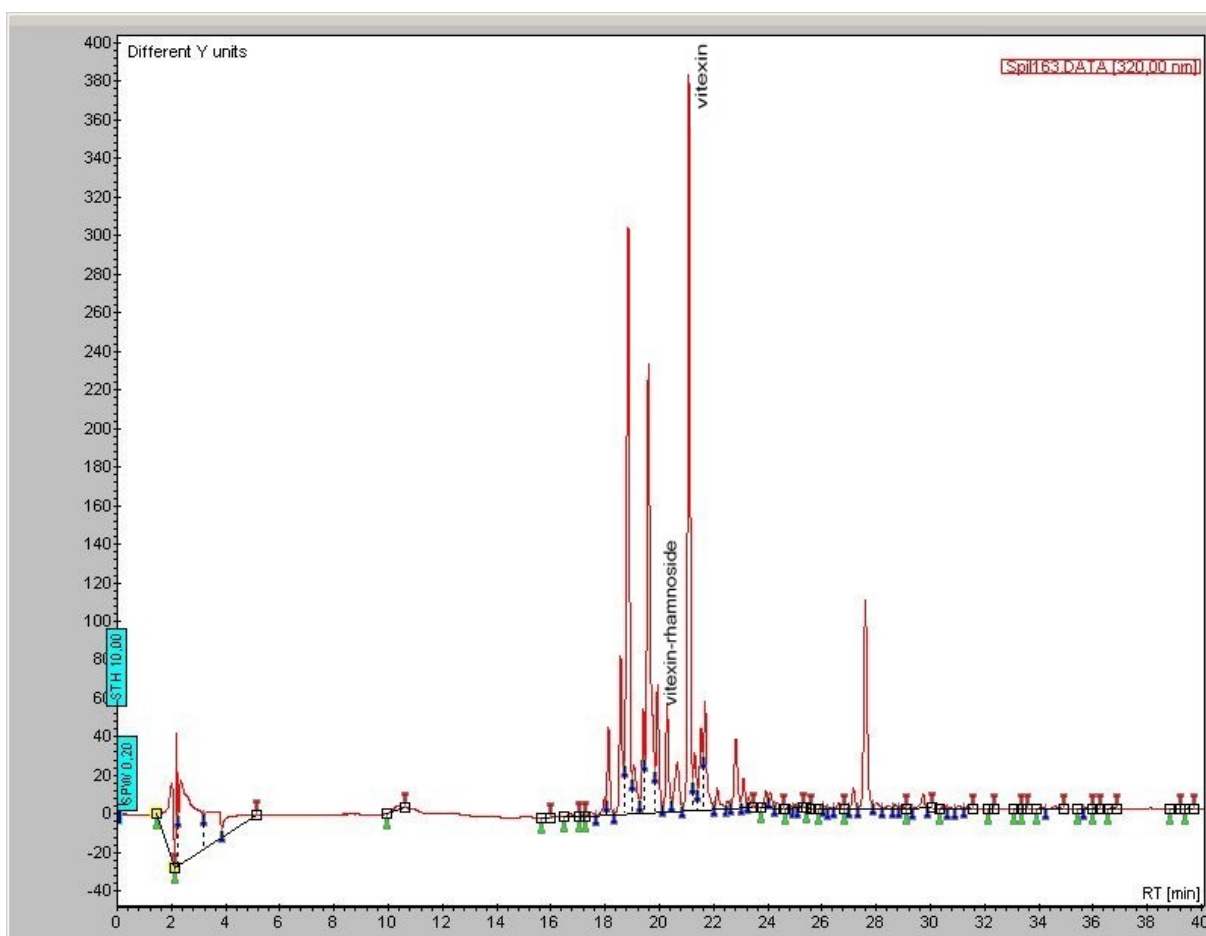


Obr. č. 10: Důkaz flavonoidů a saponinů pomocí tenkovrstvé chromatografie



Rf	UV	Důkaz flavonoidů (Naturstof)	Důkaz saponinů (Vanilin)
1,15	žlutozelená		žlutohnědá
1,0	červená		hnědá
0,6	žlutozelená		modrá
0,3 F / 0,25 S	žlutozelená	žlutohnědá	hnědomodrá

Obr. č. 11: HPLC profil látek ve vodném výluhu drogy. Vyznačeny píky vitexinu a vitexin-ramnosidu.



Tab. č. 7: Obsah flavonoidů dokázaných ve vodném výluhu methanolu z drogy

látka	obsah (%)
Vitexin	0,12
Vitexin-rhamnosid	0,02
Deriváty vitexinu	stopové množství
Apigenin	stopové množství

Tab. č. 8: Stanovení ztráty sušením

VZOREK	navážka (g)	hmotnost po vysušení (g)	ztráta sušením (%)	průměrná ztráta sušením (%)
1	2,0043	0,1466	92,69	92,38 %
2	2,0047	0,1566	92,28	
3	2,0072	0,1563	92,17	

Tab. č. 9: Stanovení celkového popela

VZOREK	navážka drogy (g)	hmotnost po vyžhání (g)	popel (%)	průměrné množství popela (%)
1	1,0106	0,8137	80,52	81,28 %
2	1,0076	0,8266	82,04	

Tab. č. 10: Stanovení popela nerozpustného v HCl

VZOREK	navážka zpopelněné drogy (g)	hmotnost po vyžhání (g)	% nerozpustného popela	průměrné množství nerozpustného popela (%)
1	0,8137	0,191	23,47	22,26 %
2	0,8266	0,174	21,05	

Tab. č. 11: Stanovení extraktivních látek v lihu

VZOREK	navážka drogy (g)	hmotnost extraktu (g)	množství extraktivních látek %	průměrné množství extraktivních látek (%)
1	5,0126	0,3716	10,9	12,74 %
2	5,0081	0,2764	15,00	
3	5,0072	0,3085	12,32	

Tab. č. 12: Stanovení extraktivních látek ve vodě

VZOREK	navážka drogy (g)	hmotnost extraktu (g)	množství extraktivních látek %	průměrné množství extraktivních látek (%)
1	5,0004	0,2186	17,68	27,31 %
2	5,0081	0,3952	31,97	
3	5,0072	0,398	32,29	

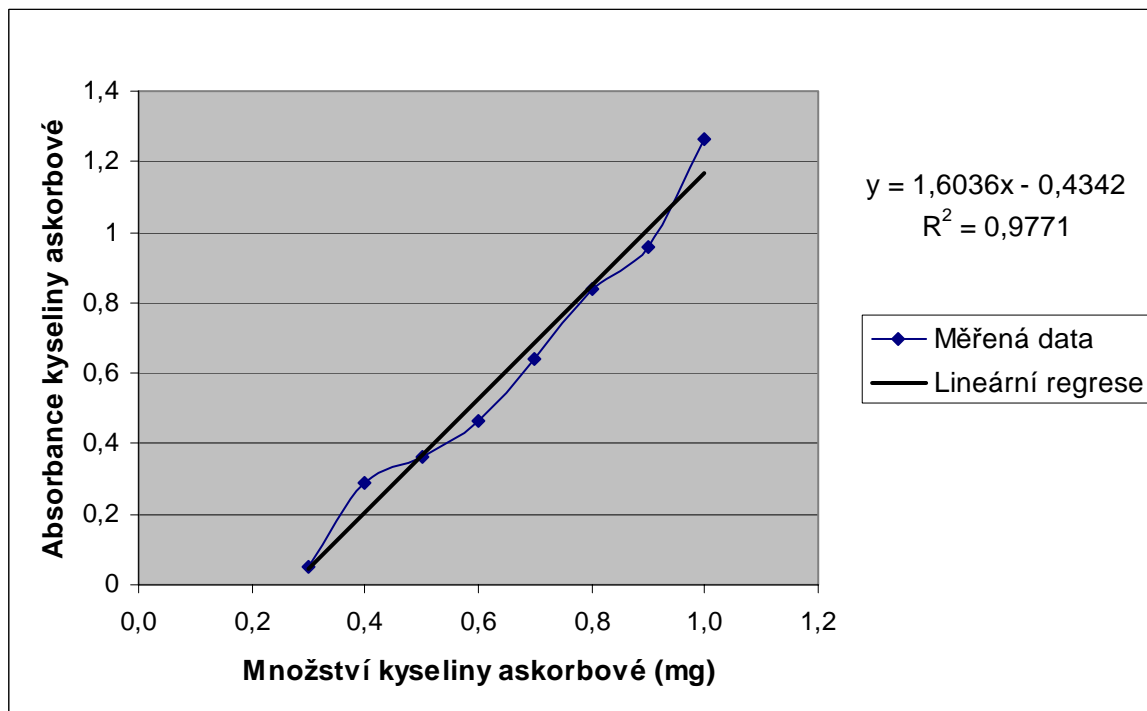
Tab. č. 13: Stanovení obsahu flavonoidů v droze

VZOREK	navážka drogy (g)	Absorbance	obsah flavonoidů (%)	průměrný obsah flavonoidů (%)
1	0,2039	0,115	0,705	0,726
2	0,2020	0,117	0,724	
3	0,2020	0,121	0,749	

Tab. č. 14: Kalibrační graf pro stanovení obsahu kyseliny askorbové (AA)

objem roztoku AA (ml)	množství AA (mg)	A ₁	A ₂	průměrná A
0,3	0,3	0,046	0,052	0,049
0,4	0,4	0,315	0,265	0,290
0,5	0,5	0,406	0,314	0,360
0,6	0,6	0,466	0,462	0,464
0,7	0,7	0,675	0,606	0,641
0,8	0,8	0,793	0,880	0,837
0,9	0,9	0,888	1,030	0,959
1,0	1,0	1,404	1,128	1,266

Graf č. 1: Kalibrační graf (1mg/1ml)



Tab. č. 15: Stanovení obsahu kyseliny askorbové v čerstvé nati

objem extraktu (ml)	množství čerstvé nati (g) v 1ml	A₁	A₂	A₃	průměrná absorbance	množství kys. askorbové (mg)
1,0	0,31	0,219	0,208	0,222	0,216	0,171 mg

Tab. č. 16: Stanovení obsahu kyseliny askorbové v upráškované droze

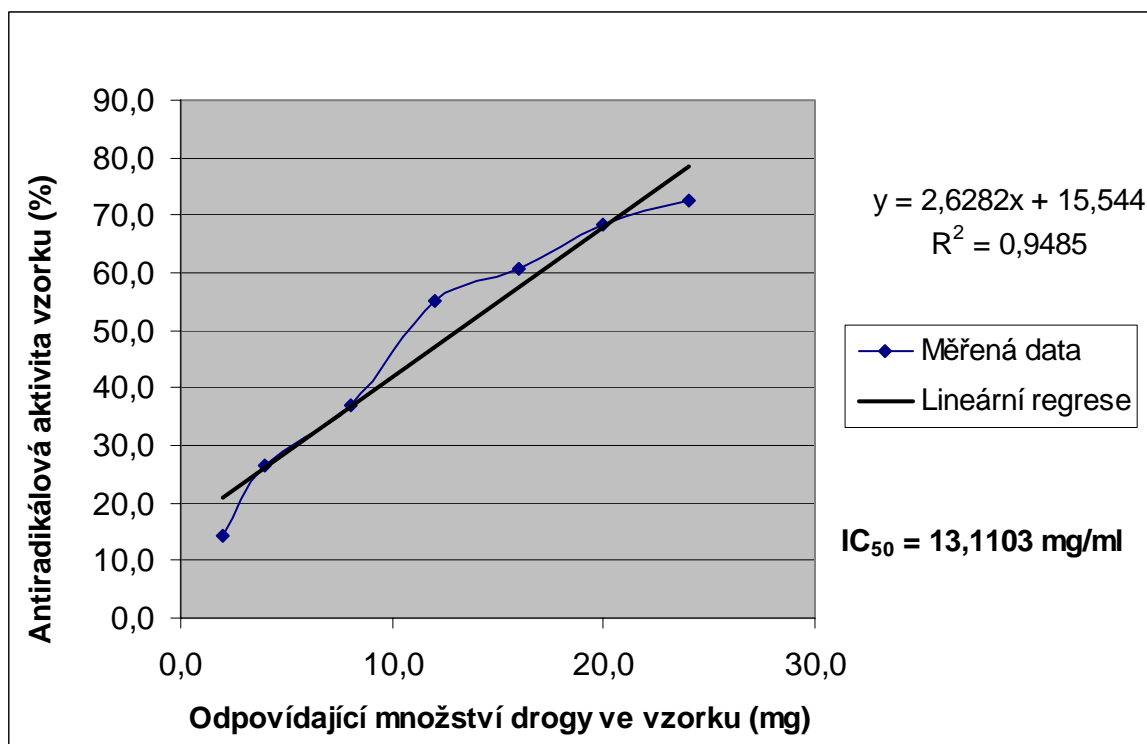
objem extraktu (ml)	množství drogy (g) v 1ml	A₁	A₂	A₃	průměrná absorbance	množství kys. askorbové (mg)
1,0	0,23	0,140	0,146	0,155	0,147	0,116 mg

Tab. č. 17: Antiradikálová aktivita methanolového extraktu (inkubace za obyčejné teploty)

Absorbance roztoku DPPH: 0,824 nm

objem vzorku (ml)	množství drogy ve vzorku (mg)	VZOREK 1		VZOREK 2		PRŮMĚR		VSO
		A	AA (%)	A	AA (%)	A	AA (%)	
0,05	2,0	0,718	12,86	0,693	15,90	0,706	14,38	2,145
0,1	4,0	0,592	28,16	0,618	25,00	0,605	26,58	2,231
0,2	8,0	0,517	37,26	0,519	37,01	0,518	37,14	0,172
0,3	12,0	0,382	53,64	0,359	56,43	0,371	55,04	1,974
0,4	16,0	0,288	65,05	0,358	56,55	0,323	60,80	6,007
0,5	20,0	0,218	73,54	0,305	62,99	0,262	68,26	7,466
0,6	24,0	0,200	75,73	0,251	69,54	0,226	72,63	4,377

Graf č. 2: Methanolvý extrakt

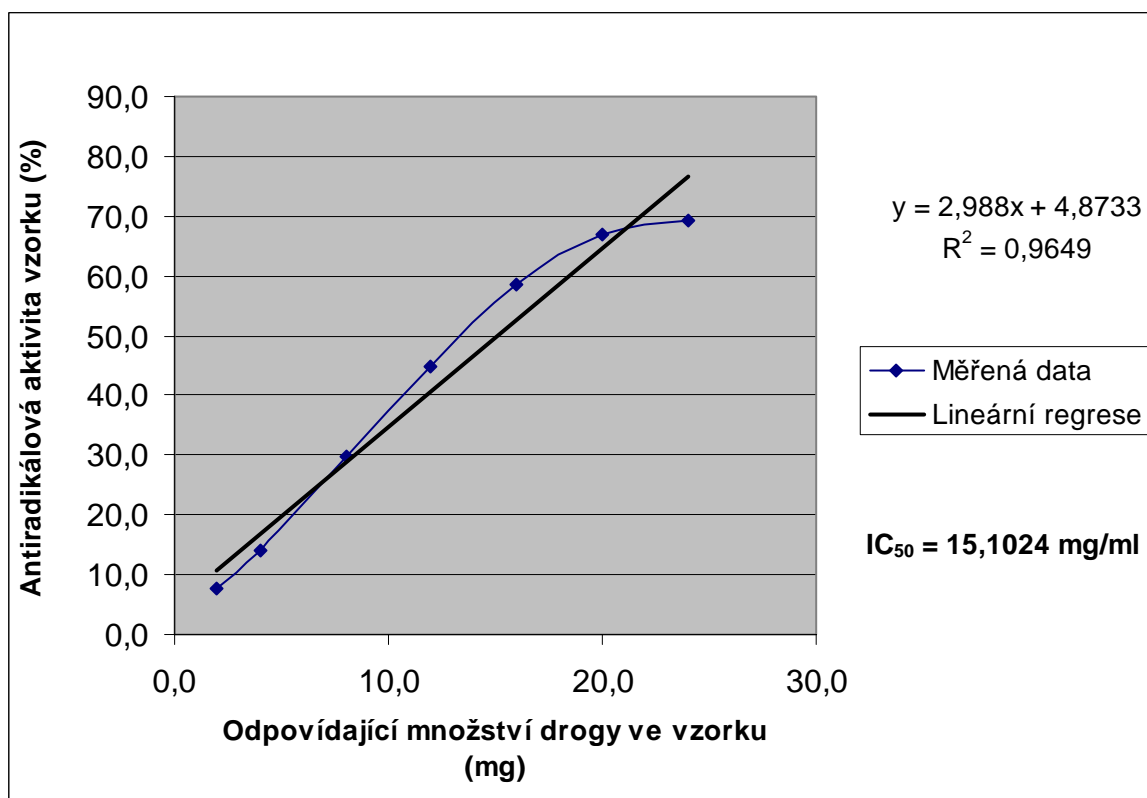


Tab. č. 18: Antiradikálová aktivita methanolového extraktu (inkubace při teplotě 37°C)

Absorbance roztoku DPPH: 0,774 nm

objem vzorku (ml)	množství drogy ve vzorku (mg)	A	AA (%)
0,05	2,00	0,715	7,62
0,1	4,00	0,664	14,21
0,2	8,00	0,543	29,84
0,3	12,00	0,426	44,96
0,4	16,00	0,321	58,53
0,5	20,00	0,257	66,80
0,6	24,00	0,239	69,12

Graf č. 3: Methanolvý extrakt

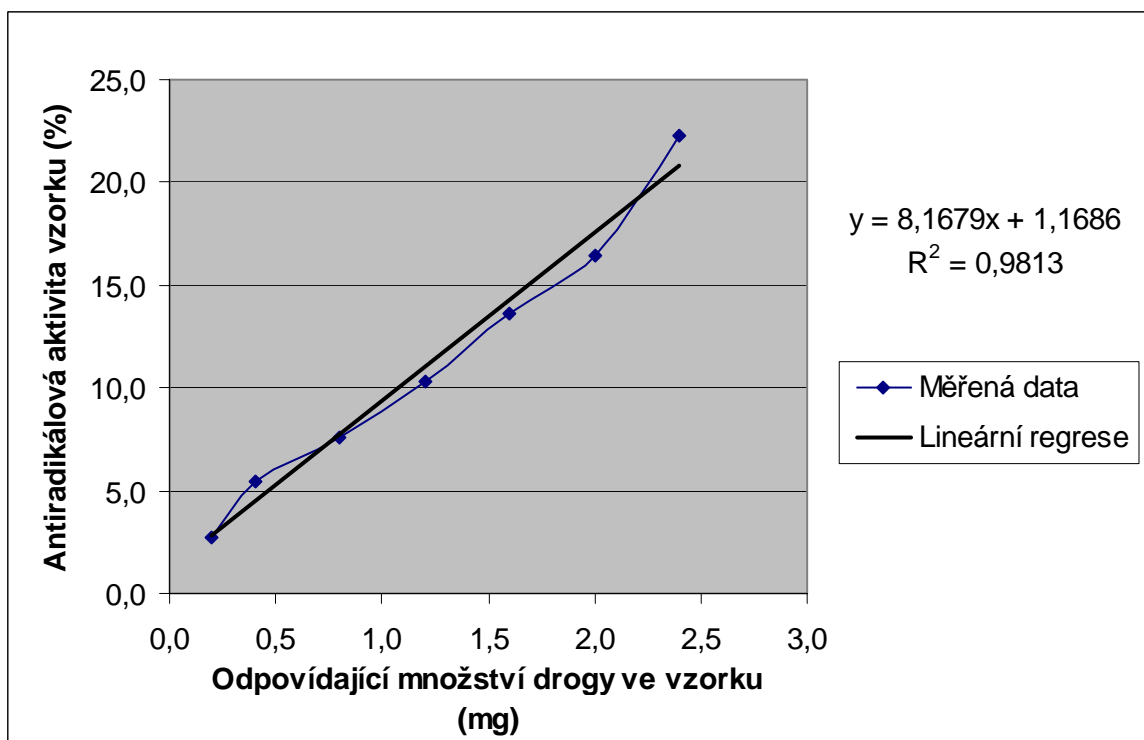


Tab. č. 19: Antiradikálová aktivita methanolové extraktu vypřepaného petroletherem

Absorbance roztoku DPPH: 1,015 nm

objem vzorku (ml)	množství drogy ve vzorku (mg)	A	AA (%)
0,05	0,20	0,987	2,76
0,1	3,94	0,96	5,42
0,2	0,80	0,938	7,59
0,3	1,20	0,91	10,34
0,4	1,60	0,877	13,60
0,5	2,00	0,848	16,46
0,6	2,40	0,789	22,27

Graf č. 4: Methanolový extrakt vytřepaný petroletherem

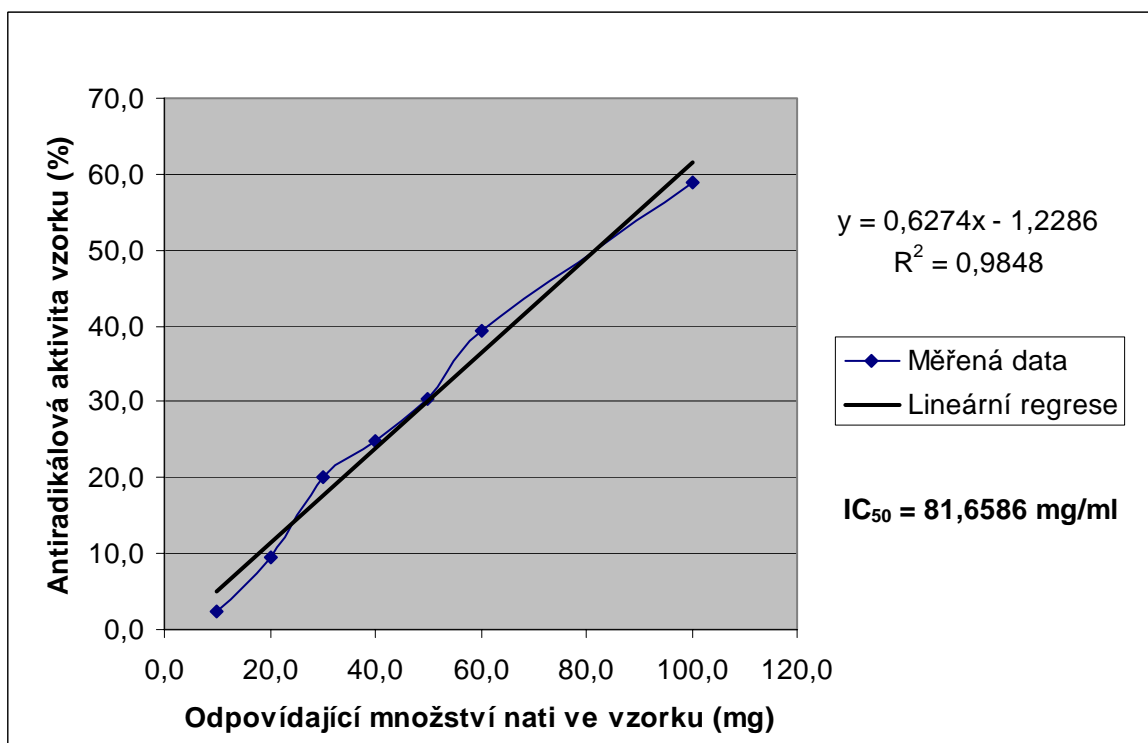


Tab. č. 20: Antiradikálová aktivita vodně-methanolového extraktu

Absorbance roztoku DPPH: 1,827 nm

objem vzorku (ml)	množství nati ve vzorku (mg)	A	AA (%)
0,1	10,0	1,783	2,41
0,2	20,0	1,651	9,63
0,3	30,0	1,462	19,98
0,4	40,0	1,371	24,96
0,5	50,0	1,27	30,49
0,6	60,0	1,106	39,46
1,0	100,0	0,75	58,95

Graf č. 5: Vodně-methanolový extrakt

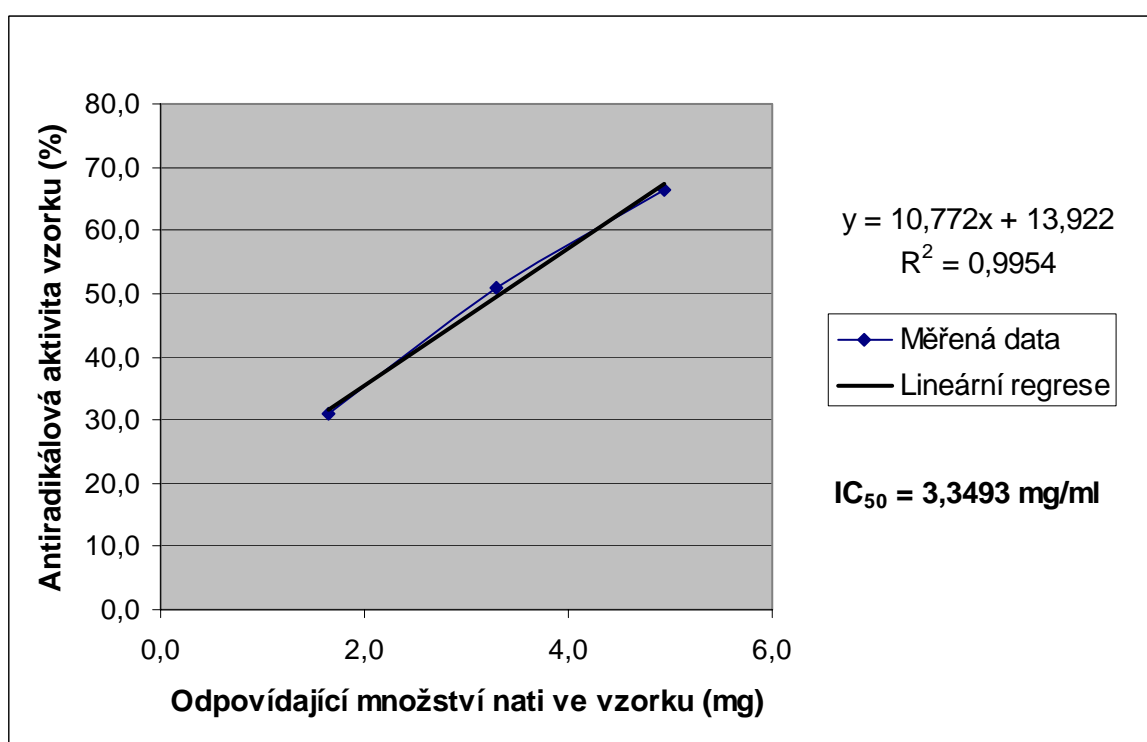


Tab. č. 21: Antiradikálová aktivita vodně-methanolového extraktu vyloučeného petroleem

Absorbance roztoku DPPH: 1,913 nm

objem vzorku (ml)	množství nati ve vzorku (mg)	A	AA (%)
0,1	1,65	1,32	31,00
0,2	3,30	0,94	50,86
0,3	4,95	0,64	66,54

Graf č. 6: Vodně-methanolový extrakt vyloučený petroleem

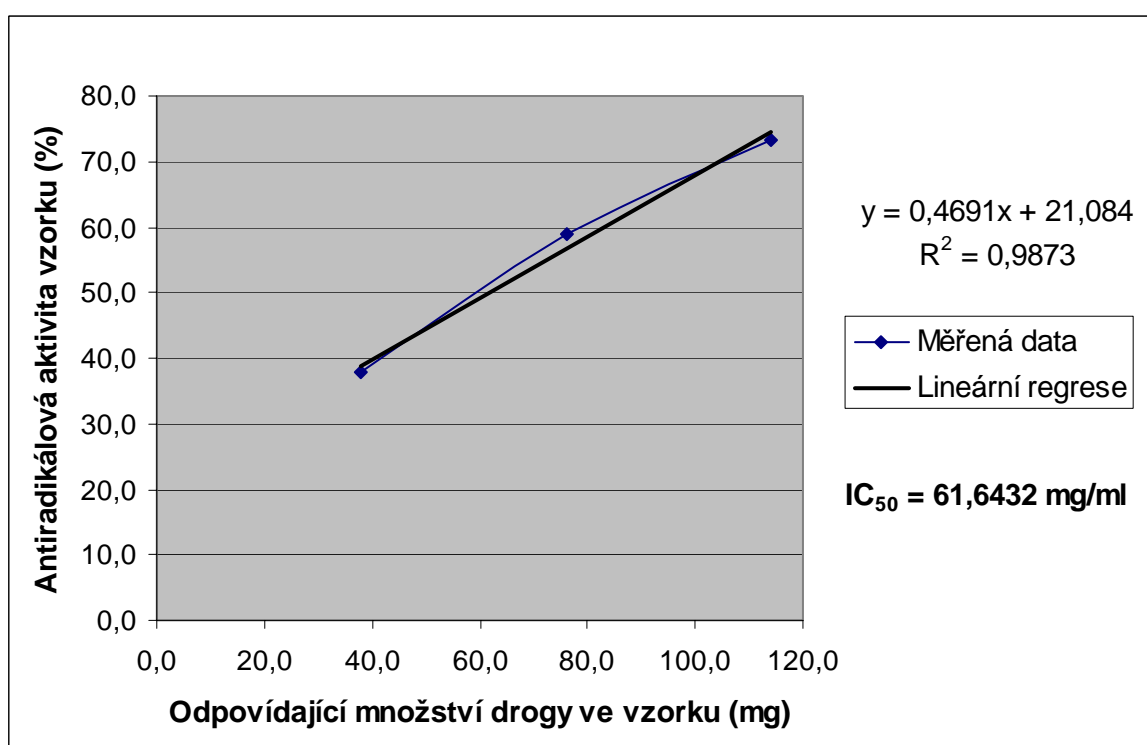


Tab. č.22: Antiradikálová aktivita methanolového extraktu vytřepaného chloroformem

Absorbance roztoku DPPH: 1,913 nm

objem vzorku (ml)	množství drogy ve vzorku (mg)	A	AA (%)
0,1	38,0	1,191	37,74
0,2	76,0	0,783	59,07
0,3	114,0	0,509	73,39

Graf č.7: Methanolový extrakt vytřepaný chloroformem

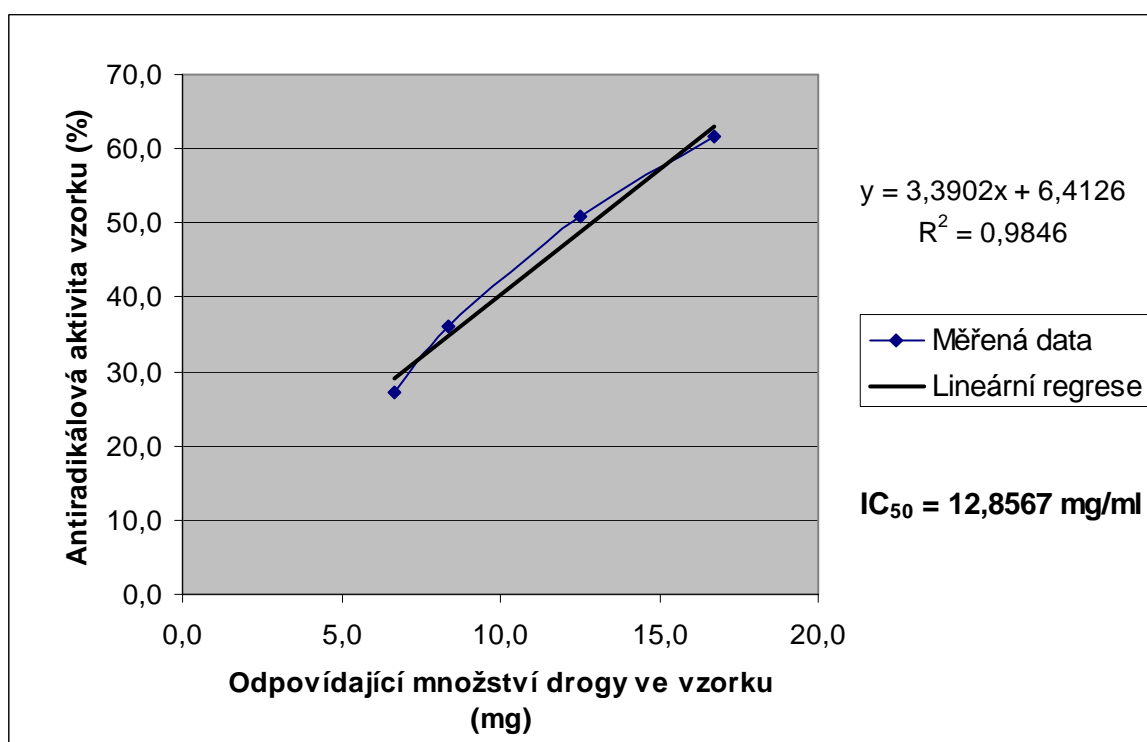


Tab. č. 23: Antiradikálová aktivita lyofilizovaného vodného extraktu

DPPH: 0,967 nm

objem vzorku (ml)	množství drogy ve vzorku (mg)	VZOREK 1		VZOREK 2		PRŮMĚR		VSO
		A	A (%)	A	A (%)	A	A (%)	
0,8	6,69	0,704	27,20	-	-	0,70	27,20	
1,0	8,36	0,634	34,44	0,603	37,64	0,62	36,04	2,267
1,5	12,54	0,476	50,78	0,474	50,98	0,48	50,88	0,146
2,0	16,72	0,385	60,19	0,355	63,29	0,37	61,74	2,194

Graf č. 8: Lyofilizovaný vodný extrakt



Tab. č. 24: Zhášení superoxidového radikálu

Navážka lyofilizátu (vzorek č. 1): 0,0677 g

Navážka lyofilizátu (vzorek č. 2): 0,0694 g

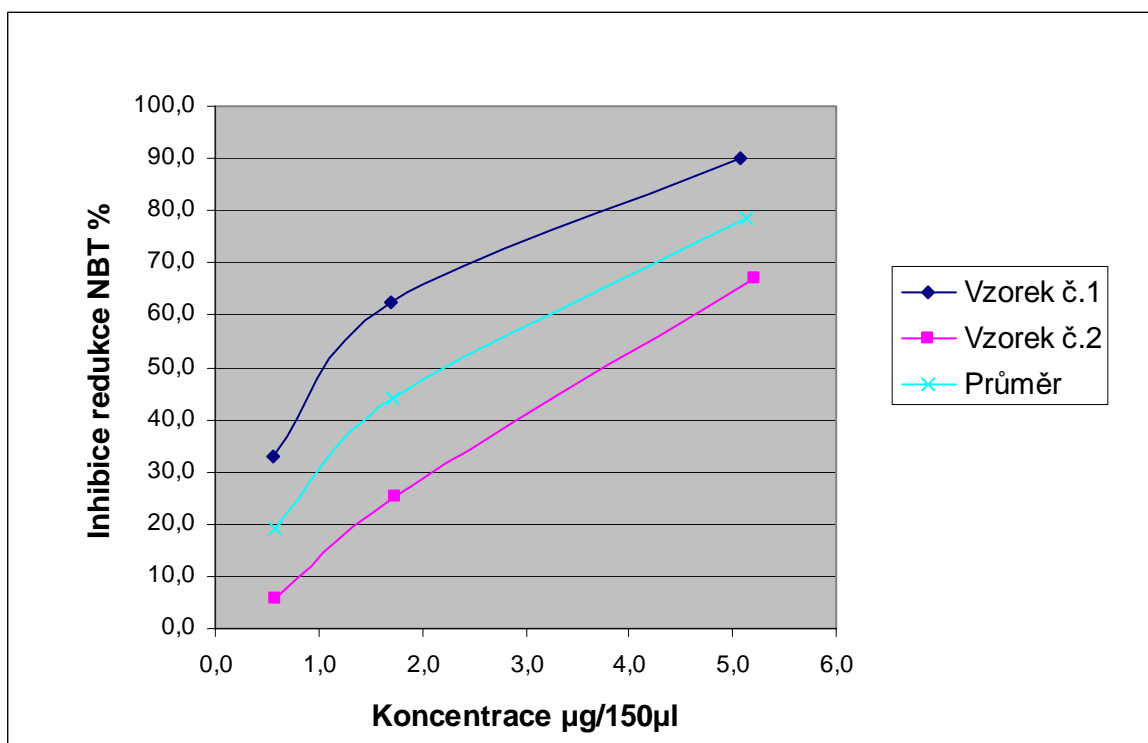
VZOREK č. 1	koncentrace μg/150μl	A	průměrná absorbance	inhibice redukce NBT %	kontrola
1. měření	5,0775	0,0032	0,0047	89,86	0,0490
		0,0033			0,0450
		0,0076			0,0450
					0,0463
2. měření	1,6925	0,0209	0,0174	62,37	
		0,0120			
		0,0194			
3. měření	0,5642	0,0303	0,0310	33,02	
		0,0277			
		0,0351			

VZOREK č. 2	koncentrace μg/150μl	A	průměrná absorbance	inhibice redukce NBT %	kontrola
1. měření	5,205	0,0100	0,0152	67,19	0,0490
		0,0195			0,0450
		0,0161			0,0450
					0,0463
2. měření	1,735	0,0367	0,0345	25,47	
		0,0427			
		0,0242			
3. měření	0,5783	0,0423	0,0437	5,61	
		0,0454			
		0,0435			

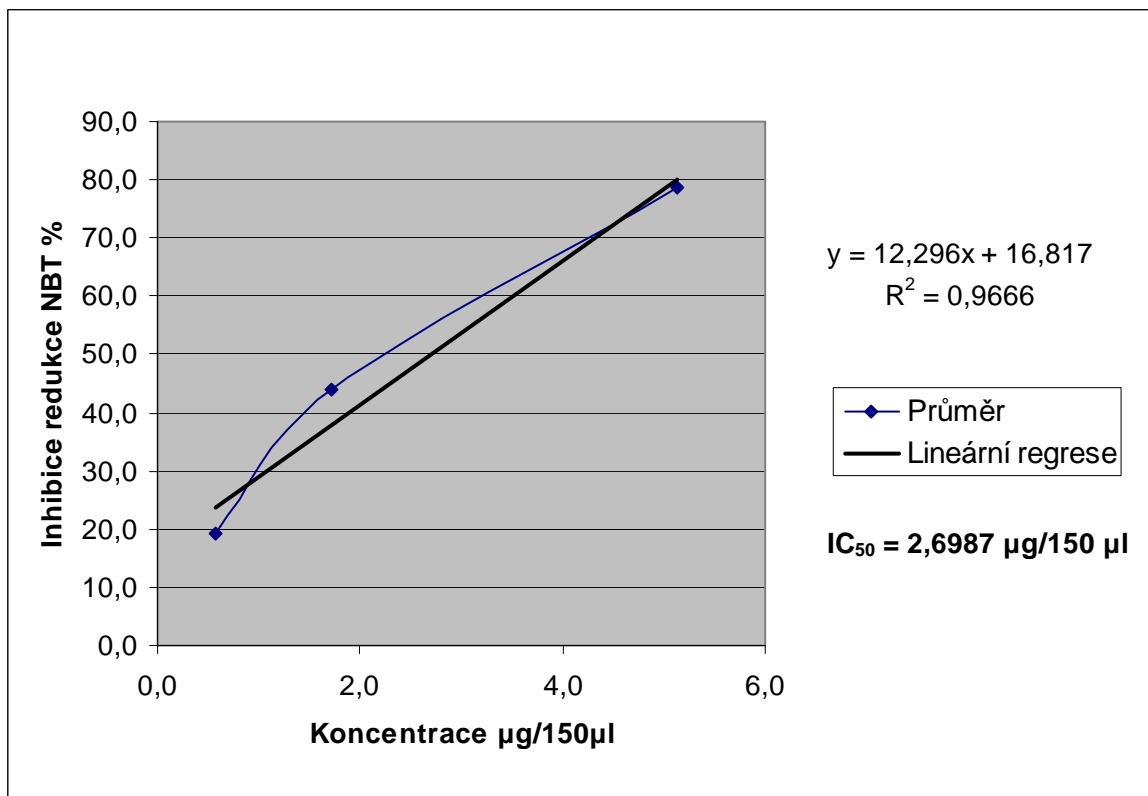
Tab. č. 25: Průměrné hodnoty inhibice redukce NBT

Koncentrace μ g/150μl	5,14125	1,71375	0,57125
Inhibice redukce NBT %	78,53	43,92	19,32
Směrodatná odchylka	11,33094	18,45324	13,70504

Graf č. 9: Závislost inhibice NBT na koncentraci lyofilizátu vodného výluhu drogy



Graf č. 10: Průměrná inhibice redukce NBT %



6. Diskuze

S. media je známý všudypřítomný plevel, tradičně používaná léčivka a potravina. V rostlině byly nalezeny zajímavé obsahové látky, které nabízejí využití pro své účinky. Jako např. dichotominy, cyklické peptidy, vykazují cytotoxickou aktivitu a inhibují cyklooxygenázu, dichotomosidy uplatňující se v pozdní fázi alergické reakce nebo velké množství lipidů, mezi nimi i β -sitosterol- β -D-glukosid a hentriacontan mající protizánětlivé účinky. Významný je i obsah kyseliny askorbové, kyseliny γ -linolenové, karotenoidů a flavonoidů. *S. media* také vykazovala inhibiční vliv proti *Pseudomonas aeruginosa*.

Tato práce je zaměřena na studium antioxidační aktivity extraktů SM. Zaměřila jsem se také na vypracování zkoušek totožnosti a zkoušek na čistotu pro *Stellaria herba* a identifikaci a stanovení obsahu látek o nichž je již známo, že se vyznačují antioxidační aktivitou. Pozornost byla věnována kyselině askorbové a flavonoidům.

Podle J.A. Duka (23) se ve 100 g *Stellaria media* (L.) Vill. nachází 375 mg kyseliny askorbové. Další zdroje uvádějí množství k. askorbové, které je ale rozdílné. V rostlině rostoucí ve Španělsku bylo nalezeno 73 mg kyseliny askorbové a 16 mg kyseliny dehydroaskorbové ve 100 g čerstvé nati (24) a podle další studie (25) bylo ve 100 g drogy obsaženo 49 mg kyseliny askorbové. Ve své práci jsem stanovila obsah k.a. spektrofotometricky a zjistila jsem, že 100 g čerstvé nati obsahuje 55,16 mg kyseliny askorbové a 100 g drogy 50,43 mg kyseliny askorbové (Tab. č. 14 - 16 a graf č. 1). V porovnání s literaturou (24, 25) jsou zjištěné výsledky srovnatelné. Doporučená denní dávka vitamínu C je 50-100 mg (48), což by v přepočtu představovalo 90,6-181,3 g čerstvé nati *Stellaria media* (L.) Vill. nebo 99,1-198,3 g drogy.

Dalšími studovanými antioxidanty byly flavonoidy. Spektrofotometrickým stanovením obsahu celkových flavonoidů jsem zjistila, že nať obsahuje 0,726 % flavonoidů (počítáno jako hyperosid) (Tab. č. 13). HPLC analýzou (obr. č. 11, tab. č. 7) byl zjištěn výskyt flavonoidů: vitexinu (0,12 %) a vitexin-rhamnosidu (0,02 %) a stopová množství apigeninu a derivátů vitexinu. Vitexin je flavonoid typický např. pro drogu *Crataegi folium cum flore*.

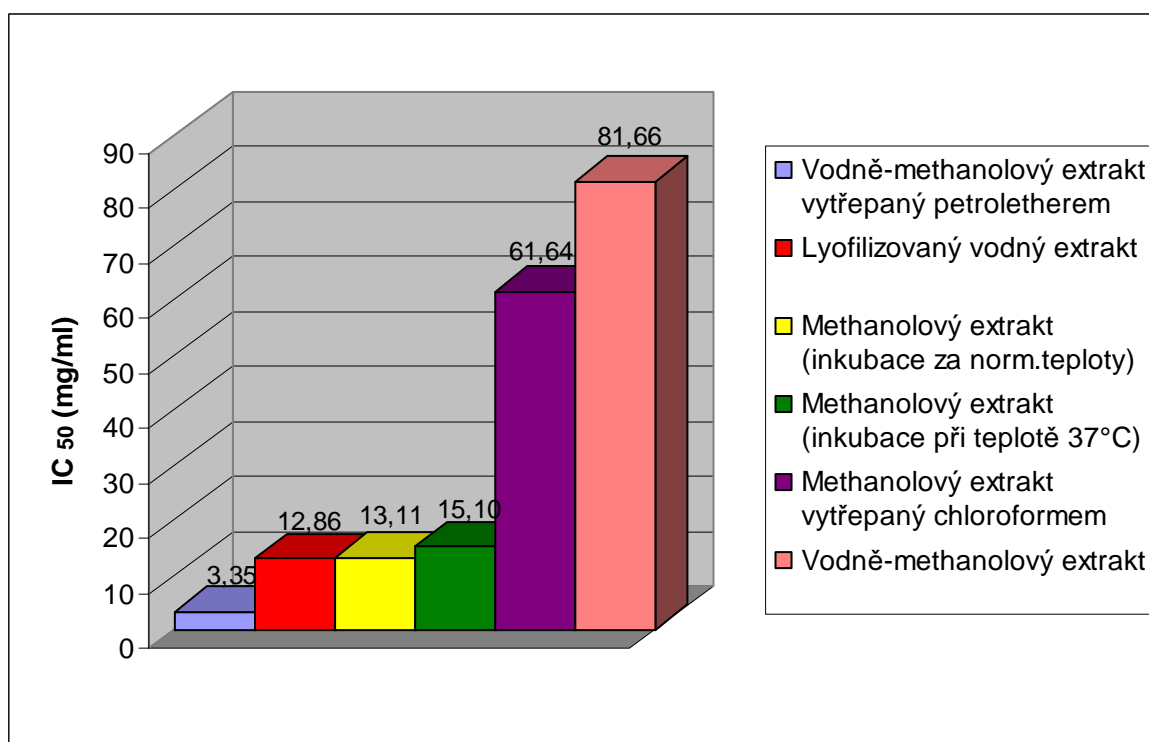
Dále jsem zaměřila pozornost na zjištění antioxidační aktivity extraktů nati. Testována byla schopnost extraktů redukovat DPPH radikál a zhášení superoxidu. Antioxidační aktivita byla sledována u methanolového extraktu, vodně-methanolového extraktu, vodně-methanolového extraktu vytřepaného petroletherem, methanolového extraktu vytřepaného chloroformem a lyofilizovaného vodného výluhu (Tab. č. 17 – 23,

grafy č. 2 - 8). Pro porovnání antioxidační aktivity byly vypočítány hodnoty IC_{50} . Výsledky uvádí Tab. č. 26 a graf č. 11.

Tab. č. 26: DPPH zhášecí aktivita extraktů nati

Vzorek	IC_{50} (mg/ml)
Vodně-methanolový extrakt vytřepaný petroletherem	3,3493
Lyofilizovaný vodný extrakt	12,8567
Methanolový extrakt (inkubace za norm.teploty)	13,1103
Methanolový extrakt (inkubace při teplotě 37°C)	15,1024
Methanolový extrakt vytřepaný chloroformem	61,6432
Vodně-methanolový extrakt	81,6586

Graf č. 11: Antiradikálová aktivita extraktů *Stellaria media* (L.) Vill.



Radikál DPPH zhášely metanolové extrakty a lyofilizovaný vodný výluh se stejnou intenzitou. Jak je patrné z grafu, inkubace při teplotě 37°C nebo za normální teploty neovlivnila výslednou antioxidační aktivitu metanolových extraktů. Jako neúčinnější se ukázal vodně-methanolový extrakt vytřepaný petroletherem s IC_{50} 3,3493 mg/ml a nejméně účinný byl vodně-methanolový extrakt. Nízkou antioxidační aktivitu také projevil methanolový extrakt vytřepaný chloroformem (IC_{50} = 61,6432 mg/ml).

Vytřepání extraktů petroleterem resp. chloroformem, mělo za cíl odstranit především chlorofyl, jehož přítomnost by rušila stanovení. Jak ukazují hodnoty IC_{50} u vytřepaných extraktů, může být tak překvapivý rozdíl v antioxidační aktivitě extraktu vytřepaného chloroformem způsobený odstraněním i dalších látek s antioxidační aktivitou nebo nedokonalým odstraněním chlorofylu.

Pro další informace o antioxidační aktivitě bylo zvoleno testování aktivity vůči superoxidovému radikálu, který byl generován neenzymatickou metodou. Superoxid, který se tvoří reakcí PMS / NADH, redukuje nitrotetrazolinovou modř (NBT) na modře zbarvený formazan. Změna zbarvení je sledována spektrofotometricky při vlnové délce 560 nm (49). Zjistila jsem, že vodný výluh nati *S.media* (L.) Vill. má schopnost zhaset superoxidový radikál s $IC_{50} = 2,699 \mu\text{g}/150\mu\text{l}$. Výsledky měření jsou uvedené v tabulkách č.24 a 25 a v grafech č. 9 a 10. Aktivita vůči superoxidu není u této rostliny doposud v literatuře popsána.

7. Závěr

Byl vypracován mikroskopický popis a zjištěny základní farmakognostické charakteristiky drogy *Stellaria herba* pocházející ze *Stellaria media* (L.) Vill. (*Caryophyllaceae*).

Pro drogu jsou charakteristické drúzy šťavelanu vápenatého v listovém mesofylu. Jsou obsaženy ve velkých kulovitých buňkách a jsou roztroušeny po celém mesofylu a dosahují velikosti $38 \pm 6,4 \mu\text{m}$. Průduchy jsou na obou stranách listů. Na rubové straně listu jsou průměrně $42,8 \pm 4 \mu\text{m}$ dlouhé a $30,4 \pm 2,4 \mu\text{m}$ široké, na straně lícové jsou v průměru dlouhé $35,7 \pm 2,1 \mu\text{m}$ a široké $21,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$. Krycí trichomy, vícebuněčné (až 7 buněčné), zašpicatělé, se nacházejí na pokožce řapíků a jsou dlouhé přibližně $1032,7 \pm 132,1 \mu\text{m}$.

Byla stanovena ztráta sušením (92,38 %), množství celkového popela (81,25 %) a množství popela nerozpustného v HCl (22,26%). Množství extraktivních látek v lihu (12,74%) a množství extraktivních látek ve vodě (27,31%).

Tenkovrstvou chromatografií a HPLC analýzou byl zjištěn výskyt flavonoidů. Byly identifikovány: vitexin (0,12%), vitexin-rhamnosid (0,02%) a stopová množství apigeninu a derivátů vitexinu. Celkové množství flavonoidů stanovené spektrofotometricky po reakci s chloridem hlinitým činilo 0,726 % počítáno jako hyperosid.

V extraktu z čerstvé nati a z drogy byl stanoven obsah kyseliny askorbové. 0,31 g čerstvé nati obsahovalo 0,17 mg kyseliny askorbové a v 0,23 g drogy bylo zjištěno 0,12 mg kyseliny.

Antiradikálová aktivita extraktů byla hodnocena na základě schopnosti zhášet radikál DPPH a superoxid. Extrakty byly připravovány různými postupy. Největší aktivitu vůči DPPH radikálu vykázal vodně-methanolový extrakt vytřepaný petroetherem s $IC_{50} = 3,35 \text{ mg/ml}$. Aktivita dalších extraktů klesala v pořadí: lyofilizovaný vodný extrakt ($IC_{50} = 12,86 \text{ mg/ml}$), methanolový extrakt inkubovaný za normální teploty ($IC_{50} = 13,11 \text{ mg/ml}$), methanolový extrakt inkubovaný při teplotě 37°C ($IC_{50} = 15,10 \text{ mg/ml}$), methanolový extrakt vytřepaný chloroformem ($IC_{50} = 61,64 \text{ mg/ml}$) a vodně-methanolový extrakt s $IC_{50} = 81,66 \text{ mg/ml}$.

Aktivitu vůči superoxidovému radikálu vykazovaly vodné výluhy v závislosti na koncentraci s $IC_{50} = 2,6987 \mu\text{g}/150 \mu\text{l}$. Aktivita vůči superoxidu není v literatuře dosud popsána.

8. Literatura

- (1) Racek, J.: Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění, Galén, Praha 2003
- (2) Valko, M., et al.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int J Biochem Cell Biol* 2007, 39, 44-84
- (3) Paulová et al.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro, *Chem L* 2004, 98, 174-179
- (4) http://www.oxisresearch.com/oxidative_stress_complete.html
- (5) Piterková, J., et al.: Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu, *Chem L* 2005, 99, 455-466
- (6) Trna, J. et al.: Přírodní polyfenolové antioxidanty, 2002, www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf
- (7) Dadáková E., Jihočeská univerzita, České Budějovice, 2006, <http://home.zf.jcu.cz/~dadakova/index.html>
- (8) Hanneken, A. et al.: Preserving Vision in Glaucoma and Macular Degeneration: Neuroprotective Effects of the Flavonoids, *Scientific Report*, 2005
- (9) Štípek, S. et al.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Grada, 2000
- (10) Molyneux, P., et al.: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Sci Technol* 2004, 26, 211-219
- (11) Prakash, A., et al.: Antioxidant activity, www.medallionlabs.com
- (12) Scalzo, R. L.: Organic acids influence on DPPH· scavenging by ascorbic acid, *Food Chem* 2008, 107, 40-43
- (13) Brand-Williams, et al.: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm Wiss Technol* 1995, 28, 25-30
- (14) Matsumoto, H., et al.: Basis for Common Chickweed (*Stellaria media*) Tolerance to Oxyfluorfen, *Pest Biochem Physiol* 1999, 64, 47-53
- (15) Pande, A., et al.: Lipid constituents from *Stellaria media*, *Phytochemistry* 1995, 39, 709-711
- (16) Hejný, S., et al.: Květena ČR 2, Academia Praha 1990, p. 128-130
- (17) Brysting, et al.: Caryophyllaceae of the Canadian Arctic Archipelago, Dallwitz 1980 (<http://www.mun.ca/biology/delta/arcticf/car/www/intro.htm>)
- (18) Lánská, D.: Jedlé rostliny z přírody, Aventinum s.r.o. Praha 2006, p. 194
- (19) Thoms, H.: Handbuch der praktischen und wissenschaftlichen Pharmazie, Bd.V, Urban & Schwarzenberg, Berlin, Wien 1929, p. 791-793
- (20) <http://atlasbotani.eu>

- (21) Guarrera, P. M., et al.: Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy), *J Ethnopharmacol* 2005, 96, 429-444
- (22) Kitanov, G. M.: Phenolic acid and flavonoids from *Stellaria media* (L.) Vill. (Caryophyllaceae), *Pharmazie* 1992, 47, 470-471
- (23) Duke, J.A.: Handbook of medicinal herbs, CRC Press, Inc., Boca Raten 2000, p. 458-459
- (24) Guil, J. L., et al.: Nutritional and toxic factors in selected wild edible plants, *Plant Foods Human Nutr* 1997, 51, 99-107
- (25) Zennie, T. M., et al.: Ascorbic acid and vitamin A conec of edible wild plants of Ohio and Kentucky, *Econom Botan* 1977, 31, 76-79
- (26) Hodisan, V., et al.: Triterpenic saponins from *Stellaria media* (L.), *Farmacia* 1989, 37, 109
- (27) Vanhaecke, M., et al.: Complete NMR characterization of lychnose from *Stellaria media* (L.) Vill., *Carbohydrate Res* 2006, 341, 2744-2750
- (28) Morita, H., et al.: Cyclic octapeptides from *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata*, *Phytochemistry* 1997, 45, 841-845
- (29) Liu, M., et al.: Cyclization of several linear penta- and heptapeptides with different metal ions studied by CD spectroscopy, *J. Pept. Res.* 2005, 65, 55-64
- (30) Morikawa, T., et al.: Bioactive constituents from Chinese natural medicine. XIV. New glycoides of beta-carboline-type alkaloid, neolignan, and phenylpropanoid from *Stellaria dichotoma* L. var. *Lanceolata* and their antiallergic activities, *Chem Pharm Bull* 2004, 52, 1194-1199
- (31) Jamieson, G. R., et al.: The leaf lipids of some members of the Caryophyllaceae, *Phytochemistry* 1971, 10, 1575-1577
- (32) Guil-Guerrero, L., et al.: γ -linolenic acid from Caryophyllaceae seed oil, *J Am Oil Chem Soc* 2004, 81, 659-661
- (33) Liu, L. X. et al.: Fatty acid profiles of leaves of nine edible wild plants an Australian study, *J F Lip* 2002, 9, 65-71
- (34) Tolstikhina, V. V., et al.: Unusual macrocyclic diol from *Stellaria media* (L.) Vill., *Russ Chem Bull* 2000, 49 (11), 1908-1909
- (35) Dong, Q., et al.: Studies on chemical constituents from *Stellaria media*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2007, 32, 1048-1051
- (36) Kumarasamy, Y., et al.: Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity, *Ethnopharmacol* 2002, 83, 73-77

- (37) Lewer, P., et al.: Selective action of the herbicide triclopyr, *Pest Biochem Physiol* 1990, 36, 187-200
- (38) Klose, S., et al.: Dose response of weed seeds and soilborne pathogens to 1,3-D and chloropicrin, *Crop Protect* 2007, 26, 535-542
- (39) Seefeldt, S. S., et al.: Cross-resistance in chlorsulfon-resistant chockweed (*Stellaria media*), *New Zeland Plant Protect* 2001, 54, 157-161
- (40) Coupland, D., et al.: Uptake, translocation, and metabolism of mecoprop in a sensitive and a resistant biotype of *Stellaria media*, *Pest Biochem Physiol* 1990, 36, 61-67
- (41) Mathiassen, S. K., et al.: The effect of laser treatment as a weed control method, *Biosyst Eng* 2006, 95, 497-505
- (42) Berger, F., *Handbuch der Drogenkunde*, Bd IV, Verlag Wilhelm Maudrich, Wien 1954, p. 492-493
- (43) Plants for a future, <http://www.pfaf.org/index.html>
- (44) Orłowski, G., et al.: Winter of diet of reed bunting *Emberiza schoeniclus* in fallow and stubble fields, *Agric Ecosyst Environ* 2007, 118, 244-248
- (45) Dailey, T. B., et al.: Spring nectar sources for solitary bees and flies in a landscape of deciduous forest and agricultural fields: production, variability, and consumption, *Torr Bot Soc* 2006, 133, 535-547
- (46) Wagner, H. et al.: *Drogenanalyse*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1983, p. 225
- (47) Janghel, E.K., et al.: Micro determination of ascorbic acid using methyl viologen, *Talanta* 2007, 72, 1013-1016
- (48) *Český lékopis* 2002. Grada, Praha 2002
- (49) Vrchovská, V., et al.: Antioxidative properties of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) external leaves against DPPH, superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid, *Food Chem* 2006, 98, 416-425

9. Abstrakt

Antioxidační vlastnosti extraktů rostlinných drog

Hlavním předmětem diplomové práce bylo stanovení antioxidační aktivity *Stellaria media*.

Antioxidační ochrana organismu je složitý proces mechanismů, které musí být v rovnováze s produkcí volných radikálů. Nadbytek volných radikálů se označuje termínem oxidační stres. Organismus se může bránit proti volným radikálům indukujícím oxidační stres preventivními a opravnými mechanismy, fyzikálními bariérami nebo působením antioxidantů enzymatického i neenzymatického původu.

Velká pozornost je zaměřena především na působení volných radikálů v živém organismu. Jedná se hlavně o reaktivní dusíkové radikály (RNS) a reaktivní kyslíkové radikály (ROS), mezi které patří také superoxid, který však není jen škodlivým radikálem, hraje i důležitou roli při obraně organismu proti infekci. Je součástí účinné zbraně fagocytů proti bakteriím a cizorodým strukturám.

Předmětem mé diplomové práce byla *Stellaria media*, jednoletá bylina, která je označována za úporný plevel, přesto obsahuje řadu významných látek jako např.: kyselinu askorbovou, sacharidy, peptidy, glykosidy, lipidy a vyšší mastné kyseliny, karotenoidy a flavonoidy. V poslední době jsou intenzivně zkoumány. Odedávna byla rostlina používána v lidovém léčitelství při nejrůznějších onemocněních a v homeopatii.

Rostlinu jsem hodnotila z hlediska farmakognostického. Zabývala jsem se mikroskopickým pozorováním, TLC chromatografií a HPLC analýzou, stanovovala jsem ztrátu sušením, množství celkového popela, množství popela nerozpustného v HCl, stanovení extraktivních látek, flavonoidů a obsahu kyseliny askorbové v rostlině. Pro stanovení jsem využívala lékopis. U kyseliny askorbové byly zjištěné výsledky srovnatelné s literaturou.

Antiradikálová aktivita extraktů byla hodnocena na základě schopnosti zhášet radikál DPPH a superoxid. Pro stanovení antiradikálové aktivity byly použity methanолоvé, vodně-methanолоvé a vodné extrakty. Nejvýznamější antioxidační aktivitu proti DPPH vykazoval vodně-methanолоvý extrakt vytřepaný petroletherem, který byl vytřepáním zbaven téměř veškerého chlorofylu. Ostatní vzorky měly antiradikálovou aktivitu již mnohem menší. Vytřepání extraktů petroletherem, mělo za cíl odstranit především chlorofyl, jehož přítomnost rušila stanovení.

Aktivitu vůči superoxidovému radikálu vykazovaly vodné výluhy v závislosti na koncentraci.

Stellaria media je všeobecně považována za úporný plevel, přesto se v rostlině nacházejí zajímavé obsahové látky, které hrají významnou úlohu v celé řadě životně důležitých pochodů v lidském těle.

Antioxidative properties of herbal extracts

The main subject of this graduation thesis is the assessment of anti-oxidation activity of *Stellaria media*.

Anti-oxidation protection of the organism is a complex process of mechanisms, which must be in balance with the production of free radicals. The excess of the free radicals are referred to as oxidation stress. The organism is able to resist the free radicals inducing oxidation stress with the preventative and remedial mechanisms, physical barriers or with the influence of antioxidants of enzymatic and non-enzymatic origin.

Great attention is particularly paid to the incidence of free radicals in the live organism. These are mainly reactive nitrogen radicals (RNS) and reactive oxygen radicals (ROS), also including superoxide, but this is not only a harmful radical, it also plays an important role during the protection of the organism against infection. It forms a part of the effective weapon of phagocytes against bacteria and extraneous structures.

The subject of my graduation thesis was *Stellaria media*, an annual plant, which is referred to as troublesome weed, nevertheless it contains a number of important substances such as: ascorbic acid, carbohydrates, peptides, glycosides, lipids and higher fatty acids, carotenoids and flavonoids. Recently they are under intensive research. From ancient times the plant has been used in folk medicine for various types of diseases and in homoeopathy.

I have evaluated the plant from a pharmacognostic standpoint. I have carried out a microscopic examination, TLC chromatography and HPLC analysis; I have determined the drying loss, quantity of the total ash, quantity of ash insoluble in HCl, assessment of extractive substances, flavonoids and content of ascorbic acid in the plant. For the assessment I used a dispensatory. The results comparable with the literature were ascertained for ascorbic acid.

The antiradical activity of extract was assessed on the basis of the possibility to extinguish DPPH radical and superoxide. Methanol, water-methanol and aqueous extractions were used for the assessment of anti-radical activities. The water - methanol extract showed the most significant anti - oxidation activity against DPPH. This extract was shaken out with petroleum naphtha and depleted of almost all chlorophyll. Other samples showed a much smaller anti - radical activity. Shaking the extracts out using petroleum naphtha mainly helped to remove the chlorophyll as its presence was interrupting for the assessment.

Aquatic extracts showed the activity towards the superoxide radical depending on concentration.

Stellaria media is generally considered to be a troublesome weed; nevertheless the plant contains interesting content substances, which play a significant part in a wide row of the life - important processes in the human body.