



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Disertační práce

**Studium biologicky aktivních extraktů z vybraných
léčivých rostlin pro využití v moderním
potravinářském průmyslu**

**Study of biologically active extracts from selected medicinal plants
for application in modern food industry**

Autor: **RNDr. Blanka Svobodová**

Studijní program: P 2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: 2901V013 Technologie potravin

Školitel: prof. RNDr. Vlastimil Kubáň, DrSc.

Oponenti: prof. RNDr. Irena Valterová CSc.
prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc.
doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Zlín, leden 2021

© RNDr. Blanka Svobodová

Klíčová slova: *Solanum stramonifolium*, *Momordica charantia*, *antimikrobiální aktivita*, *antioxidační aktivita*, *protizánětlivá aktivita*, *antikarcinogenní aktivita*, *toxicita*, *fenolické látky*, *fortifikace potravin*

Key words: *Solanum stramonifolium*, *Momordica charantia*, *antimicrobial activity*, *antioxidant activity*, *anti-inflammatory activity*, *anticarcinogenic activity*, *toxicity*, *phenolic compounds*, *food fortification*

Plná verze disertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

Tato disertační práce byla spolufinancována z projektů Interní grantové agentury Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně číslo IGA/FT/2014/001, IGA/FT/2015/004, IGA/FT/2016/003 a IGA/FT/2017/004.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Vlastimilu Kubáňovi, DrSc. za vedení, podporu a neskutečnou trpělivost. Dále Dr. Lillian Barros a prof. Isabel Ferreira z Instituto Polytécnico de Braganca v Portugalsku za profesionální přístup, díky němuž vznikly dvě cenné publikace.

V neposlední řadě největší dík patří všem z rodiny a přátel, kteří mi pomohli najít čas potřebný ke vzniku této práce.

Přijměte mé upřímné poděkování.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala samostatně pod vedením **prof. RNDr. Vlastimila Kubáně, DrSc.** za použití literatury a zdrojů uvedených na konci mé disertační práce v seznamu použité literatury a zdrojů.

Ve Zlíně dne:

ABSTRAKT

Hlavním cílem této disertační práce bylo studium málo prozkoumaných léčivých rostlin z tropického pásma, a to z pohledu možného využití obsažených biologicky aktivních látek v moderním potravinářství. Díky rostoucímu zájmu konzumentů o funkční potraviny obohacené o přírodní složky, přispívající k udržení zdraví a prevenci civilizačních chorob, stejně jako tlaku na výrobce kvůli zajištění bezpečnosti potravin proti mikrobiální kontaminaci a prodloužení jejich trvanlivosti pomocí přidaných přírodních antioxidantů, se otevřel zcela nový trh v moderním potravinářství.

Testovány byly rostliny *Momordica charantia* L. (nadzemní část) a *Solanum stramonifolium* Jacq. (kořen, stonek, plod, list). Extrakty připravené v 80% ethanolu byly podrobeny sérii standardních testů biologické aktivity (antioxidační, protizánětlivá, protinádorová, antimikrobiální) a jejich možná toxicita byla hodnocena testem na primární buněčné linii PLP2. V rámci antimikrobiální aktivity byl sledován jak účinek proti běžným patogenům, tak proti rezistentním kmenům. Pomocí metody LC–MS byly identifikovány přítomné látky, které by mohly být zodpovědné za silný biologický účinek extraktů, a to především s důrazem na fenolické látky, jež jsou známy svou biologickou aktivitou. Jednalo se především o deriváty kyseliny hydroxyskořicové a glykosyly kvercetinu, kaempferolu a isorhamnetinu

ABSTRACT

The aim of this work was to study medicinal plants from the tropical region that are scarcely investigated, for the possible application of their biologically active compounds in the modern food industry. The increasing interest of consumers in functional foods fortified by natural ingredients providing a health benefit and civilization diseases prevention, as well as the pressure on producers concerning the food safety against microbial contamination and prolonged shelf-life using natural antioxidants, opened a new market in modern food industry.

Aerial parts of *Momordica charantia* L. and leaves, stems, fruits, and roots of *Solanum stramonifolium* Jacq. were tested. Extracts prepared in 80% ethanol were submitted to the biological activity screening (antioxidant, anti-inflammatory, antitumor and antimicrobial) and their toxicity was evaluated in primal cell line test with PLP2. As part of the antimicrobial activity screening, the inhibition of both sensitive and resistant pathogenic bacteria was studied. The identification of the phenolic compounds present in the crude extracts was performed by liquid chromatography-mass spectrometry method (LC-MS) in order to determine the molecules responsible for the strong biological effect and already attributed to significant biological activity. The present structures were mainly the derivatives of hydroxycinnamic acid and glycosylated derivatives of quercetin, kaempferol, and isorhamnetin.

OBSAH

ABSTRAKT	5
ABSTRACT.....	6
ÚVOD	10
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
1.1 Biologicky aktivní látky v moderním potravinářství	11
1.1.1 Přírodní přídatné látky	12
1.1.2 Funkční potraviny	12
1.2 Zdroje biologicky aktivních látek	13
1.2.1 <i>Momordica charantia</i> L.	14
1.2.2 <i>Solanum stramonifolium</i> Jacq.	16
1.3 Polyfenoly jako biologicky aktivní látky.....	18
1.3.1 Fenolické kyseliny	20
1.3.2 Flavonoidy	21
1.3.3 Fenolamidy.....	24
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	26
3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ.....	27
3.1 Extrakce	27
3.2 Testování biologické aktivity.....	28
3.2.1 Antimikrobiální aktivita	28
3.2.2 Antioxidační aktivita.....	29
3.2.3 Protizánětlivá aktivita	34
3.2.4 Antikarcinogenní aktivita	35
3.2.5 Cytotoxicita	36
3.3 Metody identifikace biologicky aktivních látek v extraktech.....	36
3.3.1 Kapalinová chromatografie	37
3.3.2 Hmotnostní spektrometrie.....	37
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
4.1 Chemikálie a materiál.....	40
4.2 Původ a příprava rostlinného materiálu	40
4.3 Testy biologické aktivity	41
4.3.1 Antimikrobiální aktivita	41
4.3.2 Antioxidační aktivita.....	43
4.3.3 Protizánětlivá aktivita	45
4.3.4 Antikarcinogenní aktivita	46
4.3.5 Cytotoxicita	47
4.4 LC-MS analýza přítomných fenolických látek	48
4.5 Statistická analýz dat	50

5. VÝSLEDKY	51
5.1 Extrakce MCH	52
5.2 LC-MS analýza MCH	52
5.3 Biologická aktivita MCH	57
5.3.1 Antimikrobiální aktivita MCH	57
5.3.2 Antioxidační aktivita MCH	62
5.3.3 Protizánětlivá aktivita MCH	64
5.3.4 Antikarcinogenní aktivita a cytotoxicita MCH	66
5.4 Extrakce SS	69
5.5 LC-MS analýza SS	69
5.6 Biologická aktivita SS	79
5.6.1 Antimikrobiální aktivita SS	79
5.6.2 Antioxidační aktivita SS	81
5.6.3 Protizánětlivá aktivita SS	83
5.6.4 Antikarcinogenní aktivita a cytotoxicita SS	83
6. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI	86
7. ZÁVĚR	87
SEZNAM OBRÁZKŮ	89
SEZNAM TABULEK	90
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	91
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	104
SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA	107
ŽIVOTOPIS AUTORA	109

ÚVOD

Rostliny hrají odnepaměti zásadní roli v životě člověka. Mnoho druhů rostlin je důležitým zdrojem nejen potravy, ale také tradičních léčivých přípravků a jejich bioaktivní sloučeniny, jakožto produkty metabolismu, mohou pozitivně zasahovat do podobných metabolických drah i u člověka. Používány jsou jak celé rostliny, tak extrakty, kde je koncentrace aktivních látek navýšena a které si našly uplatnění zejména v kosmetickém, farmaceutickém a postupně také potravinářském průmyslu.

Vzrůstající procento stárnoucí populace a náklady na léčbu civilizačních nemocí vede v posledních 30 letech k vývoji nových potravin, které by vedle nutriční hodnoty vykazovaly také pozitivní příspěvek v udržení zdraví a v prevenci vzniku zejména civilizačních chorob. Strava bohatá na látky s antioxidačním účinkem je spojována se sníženým výskytem degenerativních procesů, např. rakoviny a nemocí oběhového systému či Alzheimerovy nemoci. V prevenci bakteriálních infekcí způsobených kontaminovanými potravinami se uplatňují rostliny s antimikrobiálním účinkem. V současnosti se zkoumá možnost přidavku sušených či lyofilizovaných rostlin či extraktů z těchto zdrojů do potravin se snahou docílit zvýšení jejich fyziologické hodnoty nebo prodloužení jejich trvanlivosti [1].

Biologicky aktivní látky z rostlin jsou snadno dostupné, vykazují nižší vedlejší účinky, nízkou nebo žádnou toxicitu a jsou v porovnání s mnoha běžně aplikovanými syntetickými přídatnými látkami biodegradabilní [2].

Nově nalezené zdroje biologicky aktivních látek se silným účinkem jsou atraktivní a vyhledávané spotřebiteli, kteří se intenzivně zajímají o své zdraví a cíleně si vybírají potraviny pro jejich vliv na lidské zdraví. Intenzivně se rozvíjejícím odvětvím moderního potravinářství je trh s fortifikovanými potravinami, případně doplňky stravy, kde mohou extrakty ze zkoumaných tropických rostlin najít nové uplatnění.

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Vliv stravy na lidské zdraví je známým pilířem moderní výživy a podporuje zájem o nalezení nových produktů s pozitivním fyziologickým účinkem k udržení a zlepšení zdraví člověka zatěžovaného civilizačními vlivy, oxidačním stresem, nedostatkem pohybu a nevyváženou stravou. Jedním z nejvýznamnějších odvětví výzkumu v oblasti potravin je extrakce a charakterizace nových přírodních ingrediencí, které vykazují biologickou aktivitu. Tyto ingredience mohou být dále přidány do potravin (fortifikace potravin), které přispívají k udržení zdraví konzumenta.

V zásadě lze biologicky aktivní látky rostlinného původu definovat jako produkty sekundárního metabolismu, které rostlina využívá k přežití a obraně před biotickým i abiotickým stresem. Produkce těchto látek závisí na mnoha faktorech, např. rostlinném druhu, klimatických podmínkách, až po kompetitivnost prostředí kolem rostliny. Mezi nejpočetnější sloučeniny se zdokumentovanou biologickou aktivitou patří především fenolické látky [3].

Efektivita extraktů, coby složek fortifikovaných potravin v prevenci vzniku chorob, závisí do značné míry na jejich stabilitě, bioaktivitě a biologické dostupnosti aktivních složek. To představuje stále značný problém při jejich standardizaci a legalizaci před uvedením na trh.

1.1 Biologicky aktivní látky v moderním potravinářství

Látky s prokázanou biologickou aktivitou nacházejí uplatnění v potravinářství jak z pohledu požadavků výrobce, tak spotřebitele. Zachování bezpečnosti a trvanlivosti potravinářských výrobků je legislativně a logisticky vyžadovaná nutnost výroby. Na druhou stranu zvyšující se nároky na funkčnost výrobku z hlediska jeho příznivého ovlivnění zdraví jsou iniciovány ze strany spotřebitelů, a to zejména ve vyspělých zemích, kde snadno dostupné potraviny již dávno neplní pouze nutriční funkci. Biologicky aktivní látky lze přidávat do potravin zejména ve formě izolovaných sloučenin nebo standardizovaných extraktů a žádoucí jsou především jejich antimikrobiální a antioxidační účinky. Nově vznikajícím odvětvím jsou také funkční potraviny, kde je očekávaný pozitivní přínos na udržení zdraví konzumenta spojen s dalšími biologickými aktivitami.

1.1.1 Přírodní látky určené k fortifikaci potravin

S expanzí potravinářského průmyslu a zvyšujícími se požadavky na kvalitu a bezpečnost potravin, které prošly technologickými úpravami, rostl v průběhu 2. poloviny minulého století počet látek, jež měly za úkol vylepšit senzorické či kvalitativní vlastnosti potravinářských produktů, ztracené v průběhu výroby. Původně přírodní látky, používané po staletí, jako koření a rostlinné extrakty tak byly nahrazeny levnějšími syntetickými látkami. U nich bylo možno stanovit a deklarovat požadovaný efekt, jelikož se jednalo o individuální látky s konstantními a stabilnějšími vlastnostmi. Postupem času se ale začaly objevovat studie o negativních účincích některých syntetických aditiv na zdraví člověka a každoročně jsou ze seznamu povolených látek vyškrtávány ty, u nichž je vážné podezření na negativní dopad na lidské zdraví. Nadužívání syntetických aditiv také poukázalo na legislativní nedostatek, kdy je posuzována individuální látka z toxikologického hlediska, nikoli však její možná interakce s ostatními aditivami, což může vést k synergismu jak pozitivních, tak i negativních účinků. Stoupající informovanost spotřebitelů vedla k upřednostňování potravin fortifikované sloučeninami přírodního původu, které nevykazují toxicitu, a jsou v porovnání se syntetickými analogy bezpečnější. To vedlo výrobce k hledání a vývoji nových standardizovaných extraktů a látek s biologickou aktivitou z přírodních zdrojů. Jako příklad jde uvést standardizovaný extrakt z rozmarýny, jenž vykazuje vyšší antioxidační aktivitu než syntetické antioxidanty a byl jako první schválen jako přídatná látka pod označením E392 v roce 2010 [4].

1.1.2 Funkční potraviny

Myšlenka funkčních potravin se zrodila v 80. letech minulého století v Japonsku, které chtělo vyřešit narůstající náklady na léčbu chronických nemocí ve stárnoucí populaci pomocí prevence v podobě potravin pro specifické zdravotní účely. V rámci nové legislativní kategorie FOSHU (Food for Specific Health Use) byl odstartován vývoj takových potravin, které by jako součást každodenní běžné stravy vykazovaly vědecky podložený pozitivní účinek na lidské zdraví a prevenci civilizačních chorob.

V Evropské unii se tento trend začal legislativně řešit v 90. letech, kdy se řada expertů přes výživu účastnila projektu FUFOSÉ (Functional Food Science in Europe), jež měl za úkol posoudit koncepci funkčních potravin. Ačkoli dodnes neexistuje konkrétní legislativa upravující přímo funkční potraviny, je používána pracovní definice vzniklá v rámci tohoto projektu.

Funkční potravina se rozumí *potravina, u níž se uspokojivě prokázala, vedle výživových účinků, její schopnost pozitivně ovlivnit jednu či více požadovaných funkcí v těle, a to buď zlepšením zdravotního stavu nebo snížením rizika onemocnění* [5].

V zásadě lze shrnout požadavky, které musí funkční potraviny splňovat, do několika kategorií: funkční potravina je konzumována jako součást běžné stravy, nejedná se o lék, tabletu, kapsli ani jinou podobnou formu, je vyrobena z přirozených surovin, při dlouhodobé konzumaci vykazuje preventivní účinek v souvislosti s udržením zdraví konzumenta a deklarované zdravotní účinky má podloženy relevantními vědeckými studiemi. Technologicky lze potravinu obohatit o biologicky aktivní složku (např. fortifikace pomocí rostlinných extraktů, probiotických kultur, vitaminů), nebo z ní naopak odstranit nežádoucí negativně působící složky (např. odstraněním alergizujících součástí u bezlepkových výrobků, snížením obsahu tuků v dietních potravinách).

Schvalování nových potravin před uvedením na trh spadá do kompetence Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) a je regulováno *Narižením č. 2015/2283 o nových potravinách*, vydané Evropskou komisí [6]. S ním je nadále propojeno *Prováděcí narižení Komise (EU) 2017/2470*, kterým se zřídil seznam Unie pro nové potraviny [7]. Zdravotní tvrzení jsou také předkládána EFSA a řídí se *Narižením EP a Rady č. 1924/2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin* [6, 8]. V České republice je pojem funkční potravina a technologie její výroby také doposud legislativně neřešen, a tyto výrobky se musí řídit, jakožto ostatní potraviny, *Vyhláškou č. 58/2018 Sb. o doplňcích stravy a složení potravin*, která zapracovává příslušné předpisy Evropské unie [9].

Z důvodu zvyšujícího se povědomí o příznivé roli speciální výživy zájem spotřebitelů o funkční potraviny rapidně stoupá, což naznačují globální tržby v tomto odvětví ve výši 129 miliard USD v roce 2015 s predikcí dosažení 255 miliard USD v roce 2024 [10].

1.2 Zdroje biologicky aktivních látek

Rostlinná říše je nevyčerpatelným zdrojem sloučenin vykazujících biologickou aktivitu také ve vztahu k lidskému zdraví. Tyto látky jsou produkty sekundárního metabolismu a jsou rostlinami tvořeny k obraně (škůdci, patogenní mikroorganismy), vyrovnávání se s environmentálním stresem (UV záření, vysoké teploty), komunikaci (feromony), atd. Zejména rostliny

z tropických oblastí jsou pod celoročním tlakem prostředí (nepřerušované vegetační období, vysoké teploty, silné UV záření atd.) ve kterém rostou, a díky kompetici s jinými druhy rostlin proto vykazují daleko vyšší obsah a účinnost těchto látek. Z celkového množství cca 298 tisíc kategorizovaných rostlinných druhů bylo doposud probádáno a detailně testováno jen asi 5 až 15 % rostlin z hlediska biologické aktivity, přičemž u tropických rostlin je toto číslo ještě výrazně menší [11, 12]. Například 70 % rostlin s *in vitro* antikarcinogenním účinkem je právě z tropických oblastí [13]. Vodítkem je obvykle tradiční použití v lidovém léčitelství, na jehož základě se selektují perspektivní druhy pro další výzkum.

1.2.1 *Momordica charantia* L.

Momordica charantia L., lidově nazývána hořká okurka (*bitter melon*, *bitter gourd* či *karela*) z čeledi tykvovitých (*Cucurbitaceae*), jak je uvedeno níže viz tabulka 1.

Vyskytuje se v tropických a subtropických oblastech Asie, Karibiku, jižní Afriky a Jižní Ameriky, kde je také hojně kultivována pro svůj plod připomínajícím okurku, který má typicky hořkou chuť. Její planě rostoucí varianta se vyskytuje volně v tropickém pralese ostrova Trinidad a Tobago. Tato jednoletá, popínavá, řídce ochlupená rostlina s tenkými, pětiúhelníkovými lodyhami a dlouhými úponky, dorůstá délky až 2 m. List je pětilaločný. Plodem je typická pukající bobule (10–20 mm) kuželovitého tvaru s bradavičnatým povrchem, zbarveným světle zeleně, ve zralosti žlutě. Semena jsou hnědá nebo bílá, na povrchu obalena červeným míškem [16].

Rostlina je tradičně využívána zejména v podpůrné terapii diabetu. Čaj z listů se používá v různých zemích k léčbě žloutenky, hypertenze, rakoviny, revmatismu, nachlazení, malárie, zánětů, horečky, spalniček, menstruačních poruch a hubení vnitřních parazitů. Zevně je ve formě obkladů aplikována při poraněních, ekzému, lepře, hemoroidech a vaginitidě. Kořen je v Mexiku považován za silné afrodiziakum. Plod a list je také využíván v kulinářství k přípravě polévek a fazolových pokrmů.

M. charantia je bohatá na biologicky aktivní látky a její účinek byl ověřen více než 100 studiemi *in vitro* a několika desítkami klinických studií, zejména orientovanými na léčbu diabetu a virových infekcí [17–20].

Tabulka 1: Taxonomická klasifikace rostliny *Momordica charantia* L.

Botanické zařazení

Říše	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše	cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída	vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
Řád	tykvotvaré (<i>Cucbitales</i>)
Čeleď	tykvovité (<i>Cucurbitaceae</i>)
Rod	Momordica

Synonyma:

Cucumis argyi H.Lév., *Cucumis intermedius* M.Roem., *Momordica chinensis* Spreng., *M. elegans* Salisb., *M. indica* L., *M. muricata* Willd., *M. sinensis* Spreng., *M. thollonii* Cogn., *Sicyos fauriei* H. Lév. [1]

Lidová jména:

Trinidad: bitter melon, **Karibik, USA:** bitter gourd, balsam pear, balsam apple, **Čína:** ku gua, **Mexiko:** melo de ratón [2]

Použití v lidové medicíně:

Listy: diabetes, ekzém, horečka, hypertenze, lepra, malárie, nachlazení, poruchy menstruace, hemoroidy, rakovina, revma, rýma, spalničky, vaginitida, vnitřní parazitě, záněty, žloutenka,

Kořen: afrodisiakum

[1] Tropicos database, 2020; [2] Das a kol., 2009;

Při studiu účinku rostliny v léčbě diabetu byly identifikovány tři hlavní skupiny látek s hypoglykemickým účinkem, a to steroidní saponiny (charantin), alkaloidy (např. momordicin) a peptidy (p-insulin, momorcharin A a B) [21]. Momorchariny vykazaly také *in vitro* antivirovou aktivitu vůči HIV viru, Herpes viru a byla u nich klinicky potvrzena inhibice guanylátcyklasy, jež se podílí na patogenezí leukémie a psoriázy. Zjištěna byla také *in vitro* antimikrobiální aktivita extraktů z plodu a listů vůči *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, atd. [22, 23].

Hypoglykemický účinek vykazují zejména plody, kde je akumulace látek s tímto účinkem vyšší než v listech. Plod a zejména pak semena snižují hladinu

cholesterolu a triglyceridů v krvi. Skupina syntetických analogů těchto proteinů byla patentována a označena jako MAP30 a je používán např. k podpůrné léčbě rakoviny prostaty. Plody a semena obsahují polypeptid p-insulin, jenž se vlastnostmi podobá bovinnímu insulinu a je účinný v terapii diabetu I. i II. typu [24]. Při *in vivo* studiích byla potvrzena nízká toxicita všech částí rostliny podávaných orálně. Ačkoli byly extrakty z plodu a listů potvrzeny jako neškodné pro těhotné ženy, některé studie uvádí abortivní účinek na pokusných krysách a kořen může také negativně ovlivňovat dělohu [25].

1.2.2 *Solanum stramonifolium* Jacq.

Tato vytrvalá bylina z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*), viz tabulka 2, nazývaná také *cocochat*, *cat's balls*, pochází z tropické Střední a Jižní Ameriky a nyní roste hojně v tropických a subtropických oblastech Ameriky i Asie. Vyskytuje se jako planě rostoucí vzpřímená rostlina keřovitého vzrůstu (až 2 m) a je hustě otrněná na stonku a na spodní i horní straně velkých laločnatých listů. Plodem je malá, zcela chloupky pokrytá bobule (10–20 mm v průměru), která je v době zralosti oranžová až červená. Zralý plod je jedlý a často vyhledávaný zejména dětmi jako sladkokyselá, planě rostoucí pochoutka [26].

V tradičním léčení se používá jak plod, tak i list a kořen, ovšem k odlišným účelům. Proto byly v této práci zkoumány účinky zvláště u jednotlivých částí rostliny. Šťáva z plodů se aplikuje zevně na rány, svědivé vyrážky a kousance. Listy se aplikují při aftách, nachlazení a kašli, k pročištění krve a zevně také na rány. Kořen (nejčastěji odvar či tinktura) se používá při bolestech zubů, horečkách, pohlavních chorobách, rakovině a malárii. Celá rostlina pak bývá použita ve směsích na léčbu astmatu, při bolestech a problémech s játry [15, 27, 28].

Zatímco *S. stramonifolium* z Trinidadu a Tobaga nebyla doposud podrobena detailnímu studiu biologické aktivity a obsahových látek, plody pocházející z Thajska byly již studovány. Antioxidační aktivita (DPPH a ABTS test) vodných a methanolových extraktů byla popsána jako slabá, což bylo přisouzeno nízkému obsahu polyfenolických látek v plodu [29, 30]. Extrakty plodu v methanolu a ethylacetátu inhibovaly gramnegativní bakterii *Escherichia coli* (diskový difúzní test), nicméně byl neaktivní vůči patogenům jako *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pyogenase*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridians* a *Enterococci* sp. [31].

Tabulka 2 Taxonomická klasifikace rostliny *Solanum stramonifolium* Jacq.

Botanické zařazení	
Říše	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše	cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída	vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
Řád	lilkotvaré (<i>Solanales</i>)
Čeleď	lilkovité (<i>Solanaceae</i>)
Rod	<i>Solanum</i>

Synonyma:

Solanum demerarensense Dunal , *S. hirsutum* Herb.
Peurari ex Dunal, *S. maccai* Dunal , *S. platyphyllum*
 Dunal , *S. stramonifolium* Jacq., , *S.*
toxicarium Lam. ,*S. toxicarum* Rich., *S.*
trichocarpum Miq.,*S. undecimangulare* Willd. ex
 Roem. & Schult. [1]

Lidová jména:

Trinidad: coco-chat, **Brazílie:** jóa, jurubeba,
Kolombie: e-to-pa-a, kobu-yá, uvilla, **Guyána:**
 bura bura, **Peru:** shiwánkush, coconilla [1], **Indie:**
 ram begun, tide begal [2]

Použití v lidové medicíně:

Kořen: bolest zubů, malárie, horečky, rakovina,
 pohlavní choroby [3],

Listy: afty, moniliáza, nachlazení, kašel, rány [3],
 čištění krve[4]

Plody: rány, kopřivka, mravenčí kousance [3],

Celá rostlina: bolest hrudníku, astma [2], játra [5]

[1] Parr, Mellon, Colquhoun, & Davies, 2005; [2] Das a kol., 2009; [3] DeFilipps a kol., 2004; [4] Austin & Bourne, 1992; [5] Pedrollo a kol., 2016.

Na druhou stranu vodný extrakt semen, obsahující malé proteiny ($M_h < 14,4$ kDa), výrazně potlačoval růst jak grampozitivních, tak gramnegativních kmenů, konkrétně *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* a *Pseudomonas aeruginosa*, zatímco u *E. coli* a *K. pneumonia* nebyla pozorována žádná antimikrobiální aktivita [34].

Obsah biologicky aktivních látek zůstává nicméně neprobádanou oblastí. Doposud jediná studie *S. stramonifolium* z Trinidadu a Tobaga popisuje izolaci solamarginu, solasodinového glykoalkaloidu z této rostliny [35]. Ze zralých plodů *S. stramonifolium* pocházejících z Thajska byl izolován carpesterol jako látka zodpovědná za inhibici pankreatické lipázy [36]. Další nekonkrétní zmínka o fytochemickém složení udává přítomnost alkaloidů, flavonoidů, tříslovin, triterpenů a saponinů v ethanolovém extraktu kořenů z Brazílie [37].

1.3 Polyfenoly jako biologicky aktivní látky

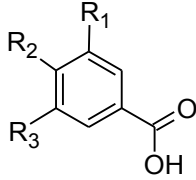
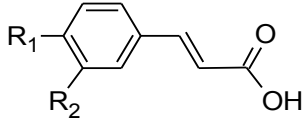
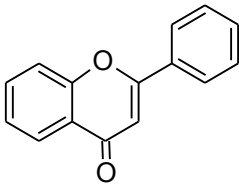
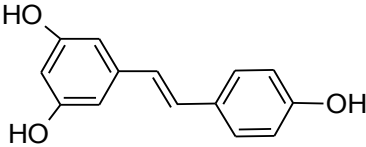
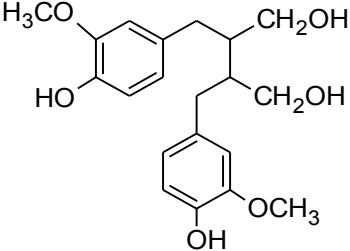
Biologicky aktivní látky vykazují jeden nebo více fyziologických účinků v jiném živém organismu. Tento účinek může být jak pozitivní, tak negativní, a jeho míra závisí na mnoha parametrech. Pokud se jedná o směs, pak se obvykle aktivita odvíjí od účinku hlavní složky, nicméně v komplexu může také docházet k interakci mezi složkami a celkové potenciaci či snížení účinku vzhledem k synergismu [38].

Jako polyfenoly se označují produkty sekundárního metabolismu vyšších rostlin. Tyto látky lze najít ve všech částech rostlin, nejvíce však v nadzemních pletivech, kde plní mnoho funkcí souvisejících zejména s ochranou rostlin před poškozením. Fenolické látky dobře absorbují v širokém pásmu UV spektra a chrání tak rostlinu před nadměrou škodlivého UV záření [39]. Vedle významu pro rostliny hrají také zásadní roli pro zdraví člověka, jelikož ten není schopen si je vyrobit pomocí vlastního metabolismu. Tyto látky pak plní funkci díky biologické aktivitě, z nichž k nejvýznamnějším patří antioxidantní působení související s množstvím civilizačních chorob, které vycházejí z porušení kaskády oxidace – zánět – chronický problém (např. rakovina, neurodegenerativní změny, kardiovaskulární nemoci, atd.) [4].

Rodina fenolických látek je velmi obsáhlá a zahrnuje tisíce struktur. Ty se rozlišují a kategorizují pomocí počtu uhlíků na základním skeletu, počtu a typu fenolových kruhů, stupni modifikace (oxidace, metylace, hydratace) a vazbami s dalšími molekulami (cukry, jiné fenolické látky). Takto rozlišujeme jednoduché fenoly (fenolické kyseliny, stilbeny, lignany, flavonoidy, naftochinony, kumariny) a kondenzované fenoly, vzniklé polymerizací lignanů (ligniny) nebo flavonoidů (taniny), což přibližuje názorně tabulka 3 na následující straně [4, 40]. Přibližně dvě třetiny příjmu fenolických látek ve stravě zastupují flavonoidy, zbytek zahrnuje fenolové kyseliny a jejich deriváty

a minoritně další látky ze skupiny polyfenolů, proto bude těmto dvěma skupinám věnována další pozornost [41, 42].

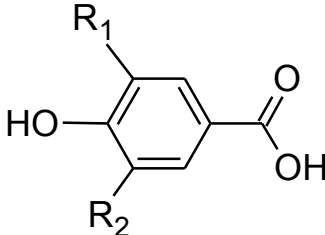
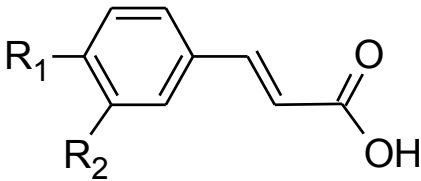
Tabulka 3 Základní třídy polyfenolických látek (přepracováno dle Manach, 2004, Pandey 2009 a Panche 2016)

Třída	Struktura	Zástupci	Zdroje
Fenolické kyseliny hydroxybenzoové kyseliny		protokatechová gallová salicylová vanilinová syringová	bobuloviny ovoce citrusy
Fenolické kyseliny hydroxyskořicové kyseliny		kumarová kávová ferulová chlorogenová	káva brambory pšenice jablka
Flavonoidy		kvercetin kaempferol rutin apigenin luteolin	ovoce zelenina čaj káva
Stilbeny		resveratrol pterostilben	hrozny arašidy granátové jablko bobuloviny
Lignany		sesamin pinoresinol secoisolariciresinol matairesinol	pohanka ječmen lněná semena sezamová semena

1.3.1 Fenolické kyseliny

Výraz fenolická kyselina všeobecně označuje fenolové jádro s navázanou karboxylovou skupinou. Nicméně v kontextu rostlinných sekundárních metabolitů se jedná o specifickou skupinu organických kyselin, vycházejících ze dvou podobných uhlíkatých struktur: hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny. Ačkoli základní skelet zůstává u derivátů stejný, liší se pozice a počet substituentů na aromatickém jádře, jak naznačuje tabulka 4 [43].

Tabulka 4 Základní fenolické kyseliny a jejich vybrané deriváty (upraveno dle Nováková a kol. [44])

Deriváty kyseliny <i>p</i> -hydroxybenzoové	Deriváty kyseliny hydroxyskořicové					
						
	R ₁	R ₂		R ₁	R ₂	R _x
<i>p</i> -hydroxybenzoové	H	H	skořicová	H	H	
protocatechová	H	OH	kávová	OH	OH	
vanilinová	H	OCH ₃	chlorogenová	OH	OH	chinonová
syringová	OCH ₃	OCH ₃	ferulová	OH	OCH ₃	
gallová	OH	OH				

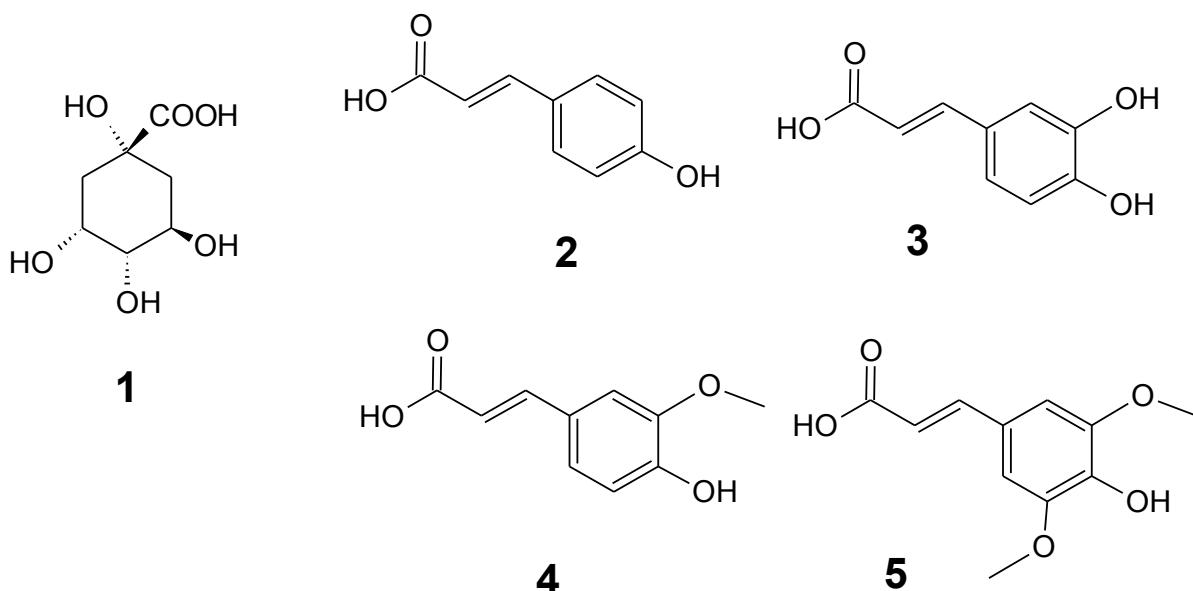
Z potravinářského hlediska jsou také fenolické látky členěny na podtřídy dle svých sensorických a funkčních vlastností. Rozeznáváme pak látky vonné (benzochinony a kumariny), barviva (anthokyaniny, lignany), chuťové (taniny), přírodní antioxidanty (flavonoidy, deriváty fenolických kyselin) [45, 46].

Fenolické kyseliny se obvykle vyskytují ve formě esterů se sacharidy (nejčastěji glykosidy), nebo jinými organickými kyselinami [43]. Takovým příkladem je velmi významná molekula – kyselina chlorogenová (5-*O*-caffeoylchinonová) a její isomery kyselina neochlorogenová

(3-*O*-caffeoylchinová) a kryptochlorogenová (4-*O*-caffeoylchinová). Nacházejí se ve vysokých koncentracích například v kávě, bramborech, ovoci a zelenině [42]. Mnohé z těchto látek vykazují jak antioxidační, protizánětlivé, antikarcinogenní, tak i antimikrobiální účinky *in vitro* i *in vivo* a získaly svou pozici na trhu s potravinovými doplňky a funkčními potravinami [1].

Deriváty kyseliny chlorogenové

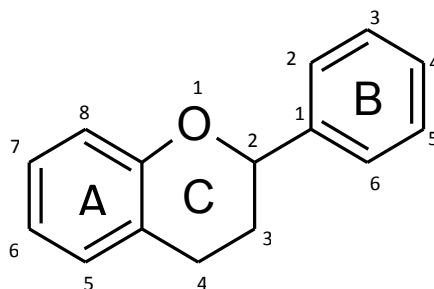
Mezi skupinu derivátů kyseliny chlorogenové (CQA) se řadí velké množství přirozeně se vyskytujících sloučenin, jež jsou syntetizovány *in planta* esterifikací kyselin C₆–C₃ *trans*-hydroxyskořicových s kyselinou D-(–)-chinovou (1). Nejčastějšími zástupci hydroxyskořicových kyselin jsou kyselina *p*-kumarová (2), kávová (3), ferulová (4) a sinapová (5), viz obrázek 1 [47].



Obrázek 1: Základní kameny derivátů kyseliny chlorogenové

1.3.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou pro člověka důležitá skupina látek, jelikož si je není schopen syntetizovat z alifatických prekursorů sám [48]. Vysoké koncentrace se nacházejí v nadzemních částech rostlin, především listech a květech, méně pak v plodech a stonku. V kořenech a hlízách je jejich množství obvykle velmi malé [49].



Obrázek 2: Základní skelet flavonoidů: flavan

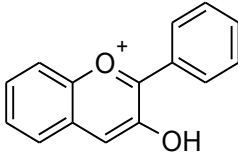
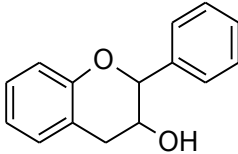
Základní kostrou všech flavonoidů je kyslíkatá heterocyklická sloučenina flavan – strukturálně difenylpyran (C₆–C₃–C₆), obsahující dva benzenové kruhy

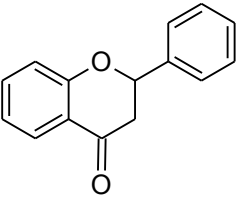
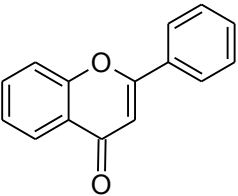
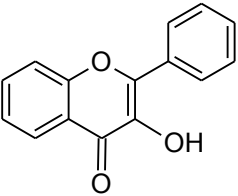
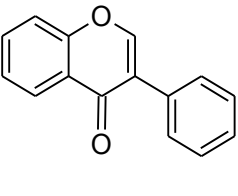
A a B spojené 2H–pyranem, viz obrázek 2. Pro upřesnění je nutno podotknout, že u podskupiny isoflavonoidů je kruh B napojen na pyranu v poloze 3 a označován jako isoflavan.

Na všech třech kruzích mohou být přítomny substituenty (hydroxyly, glykosyly, metyly, malonyly, sulfáty, karboxyly, aminy, lipidy, ostatní fenoly), což vede k velké variabilitě v této skupině přírodních látek.

Flavonoidy jde dále kategorizovat do několika základních tříd, a tona anthokyanidiny, flavonoly, flavony, flavanony, flavanoly (katechiny) a isoflavonoidy [50], jak je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5 Základní třídy flavonoidů (přepřacováno dle Manach a kol., 2004, Pandey a Rizvi, 2009 a Panche a kol., 2016, [34, 47, 48])

Třída	Struktura	Významní zástupci	Zdroje v potravě
Anthokyanidiny		delfinidin kyanidin pelargonidin petunidin	borůvky jahody ostružiny víno červené zelí
Flavanoly (katechiny proanthokyanidiny))		(-)-epikatechin gallokatechin (+)-katechin, prokyanidin	čaj víno ovoce kakao ořechy

Flavanony		eriodictyol hesperidin naringenin naringin neohesperidin	citron pomeranč grapefruit rajčata máta
Flavony		apigenin chrysin luteolin	petržel červená paprika celer
Flavonoly		kaempferol kvercetin myricetin isorhamnetin rutin	brokolice cibule čaj česnek víno hlávkový salát luštěniny
Isoflavony		biochanin A daidzein genistein	luštěniny len vojtěška (alfalfa)

Nejčetnější podskupinou flavonoidů jsou flavonoly a flavony. Majoritně se vyskytují především zástupci flavonolů kvercetin, kaempferol, isorhamnetin a myricetin a zástupci flavonů apigenin a luteolin. Kvercetin se považuje za nejrozšířenější fenolickou látku z rostlinných zdrojů a známo je přes 200 jeho glykosidů [51, 52].

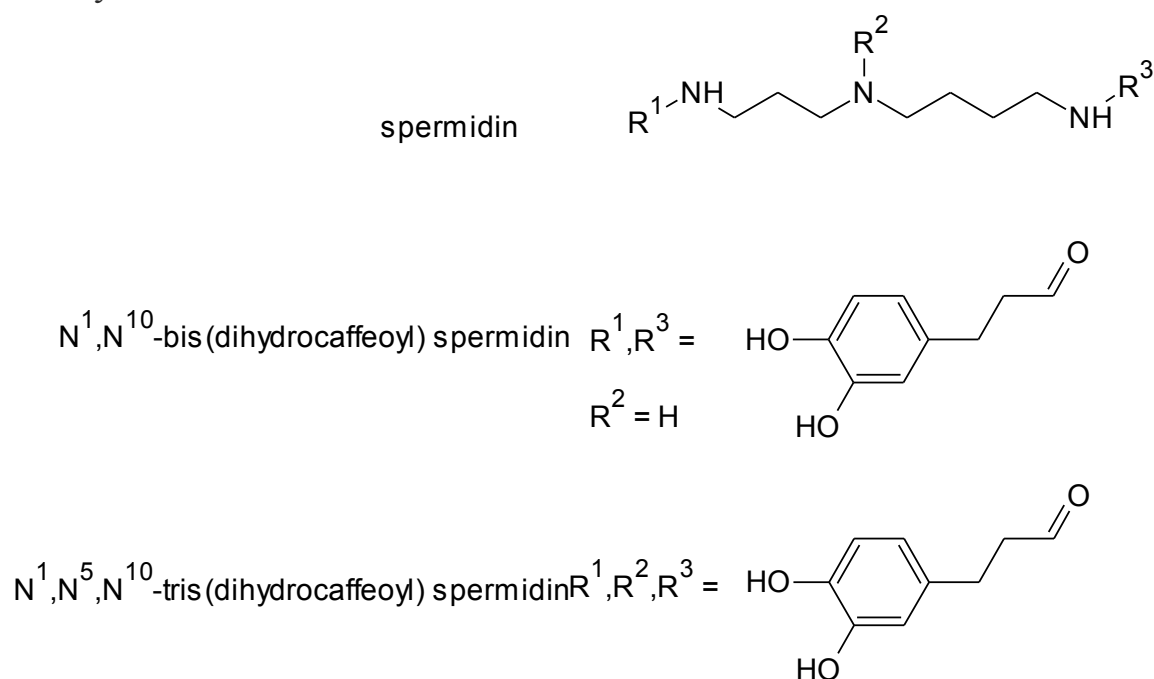
Flavonoidy se kumulují zejména ve vakuolách, dále je možno je nalézt v chloroplastech a v cytosolu, kde se účastní kaskády antioxidačních reakcí s volnými radikály. Jsou také schopny chelatovat kationty kovů a ovlivňovat pozitivně enzymy, účastníci se redoxních reakcí [53].

Funkční molekuly flavonoidů se obvykle nevyskytují volně (aglykon), ale jako *O*-glykosidy nebo minoritně jako *C*-glykosidy. Nejběžnější pozicí *O*-glykosidů je pozice 3 na A kruhu. Existuje přes 80 různých cukerných zbytků vyskytujících se ve vazbě s flavonoidy, nejčastěji to ovšem bývají monosacharidy glukóza, galaktóza, rhamnóza a arabinóza, disacharidy a oligosacharidy [52].

1.3.3 Fenylamidy

Fenylamidy, konkrétněji amidy kyseliny hydroxyskořicové, jsou specializované metabolity vyšších rostlin, které se účastní vývoje, reprodukce a ochrany rostlin. V rostlinné říši jsou velmi rozšířené. Jedná se o N-acylované biogenní aminy konjugované převážně s fenolickými kyselinami. Amid může pocházet buď z aromatických monoaminů (tyramin, tryptamin, dopamin) či alifatických aminů (putrescin, spermin, spermidin). Polyaminy mohou být dle stupně saturace aminoskupin buď monosubstituované nebo polysubstituované [54].

Spermidin obsahuje tři aminoskupiny, a proto může být mono, di až tri N-acylován. Tyto látky plní funkci fytoalexinů. Mono a disubstituované deriváty putrescinu a spermidinu byly nalezeny v semenech, kořenech, květech a reprodukčních orgánech, zatímco trisubstituované spermidiny se akumulují převážně v pylu. Byly nalezeny v pylu dubu, slunečnice, podzemnice olejné a jiných. U čeledi růžovitých představují hlavní fenolické látky. U čeledi lilkovitých bylo popsáno uvolňování fenolaminů po bakteriální a plísňové infekci a tyto látky byly nalezeny v hlízách [55]. Stejně tak byly detailně popsány deriváty putrescinu, sperminu a spermidinu (s kávovou, dihydrokávovou a ferulovou kyselinou) ve slupce brambor [56], jejichž příklady uvádí obrázek 3.



Obrázek 3: Příklady konjugátů fenolických kyselin s polyaminem spermidinem [54]

Biogenní aminy jsou produkovány také savčími buňkami i endogenně. Z argininu pomocí enzymu je syntetizován putrescin a od této struktury se dále pomocí aminopropylu z methioninu díky spermidinsyntáze a sperminsyntáze vyrábí spermidin a spermin. Zásadním místem těchto přeměn je střevní tkáň, zejména tenké střevo, kde hrají roli také střevní bakterie. Vysokou koncentraci těchto látek je možno nalézt v regenerujících se tkáních, kde je jejich syntéza evokována po poranění. Spermin a spermidin hrají roli v dělení buněk - při biosyntéze nukleových kyselin, spermin působí jako růstový faktor při regeneraci sliznice trávicího traktu a účastní se antioxidačních procesů [57, 58]. Významným zdrojem polyaminů je potrava, polyaminy se dobře absorbují [59].

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo studium extraktů tropických rostlin *Momordica charantia* L. a *Solanum stramonifolium* Jacq., jakožto potenciálních zdrojů biologicky aktivních látek pro vývoj nových fortifikovaných potravin. Z důvodu rostoucí obliby a upřednostňování přírodních komplexních standardizovaných extraktů, spíše než izolovaných látek, bude stanovena aktivita hrubých extraktů. Nicméně různorodost takovýchto směsí je nutno charakterizovat pomocí chromatografických metod identifikací a kvantifikací dominantně přítomných látek, jež mohou žádanou biologickou aktivitu reprezentovat. Zejména u extraktů rostliny *Solanum stramonifolium* Jacq., jež doposud nebyla detailně fytochemicky zkoumána, bude kladen důraz na charakterizaci a kvantifikaci přítomných látek a jejich distribuci v jednotlivých částech rostliny.

Pro naplnění cíle disertační práce bylo nutno vytyčit několik cílů dílčích:

- příprava extraktů, které by maximalizovaly zisk biologicky aktivních látek a zároveň splňovaly zvyšující se finanční a bezpečnostní nároky na rozpouštědla používaná v potravinářském průmyslu,
- stanovení antioxidační aktivity připravených extraktů pomocí standardních metod (DPPH, FRAP, TBARS, BCA),
- stanovení protizánětlivé aktivity s použitím Griessova činidla,
- stanovení cytotoxicity vůči lidským rakovinotvorným buněčným liniím (HeLa, MCF-7, NCI-H460 a HepG2) a vůči primární jaterní buněčné linii PLP2,
- stanovení antimikrobiální aktivity vůči vybraným bakteriím,
- LC-MS analýza fytochemických látek, zejména fenolických kyselin a polyfenolických látek a následně jejich kvantifikace v jednotlivých extraktech pomocí standardů.

3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

V této kapitole jsou podrobně popsány teoretické principy metod, které byly použity pro přípravu rostlinného materiálu k vyhodnocení biologické aktivity zvolených extraktů a k identifikaci látek, které by mohly být zodpovědné za tyto účinky.

3.1 Extrakce

Extrakce je významným parametrem, ovlivňujícím kvalitu i kvantitu biologicky aktivních látek ve výsledném extraktu. Vliv na výsledné vlastnosti extraktu má jak volba vhodného rozpouštědla, tak metodika extrakce. Eloff [60] při porovnání rozpouštědel pro maximalizaci zisku antimikrobiálních látek z matrice zjistil, že aceton poskytuje nejlepší výsledky, ačkoli je v publikovaných studiích nejméně používaným. U antioxidantního účinku je situace opačná, tam nejlépe působí obvykle vodné extrakty. V potravinářství je kladen čím dál větší důraz na bezpečnost použitého rozpouštědla a možná rezidua ve výsledném extraktu. Evropská unie a direktiva REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) klade důraz na ekologii, obnovitelné zdroje a substituci ropných produktů hledáním tzv. „zelených“ technologií extrakce [61].

Ethanol je jedním z nejpoužívanějších organických rozpouštědel v potravinářství, jelikož je levný, recyklovatelný a netoxický. Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, Food and Drug Administration) jej řadí mezi látky všeobecně považované za bezpečné, tzv. „GRAS“ látky (*Generally Recognised As Safe*) [62]. Přídavek vody k organickému rozpouštědlu, jako ethanol, zvyšuje obvykle efektivitu extrakce. V případě fenolických látek je dosahováno nejvyšších výtěžků v 80 % ethanolu [63]. Vodný roztok ethanolu poskytuje mnoho výhod. Hydrofilní i částečně lipofilní látky se extrahují společně v různých poměrech a v médiu se tudíž mohou objevit pozitivní synergické interakce [64].

Proto se jeví jako ideální volbou kombinace vody a etanolu. I z hlediska etnobotanického jsou tyto kapaliny (vedle oleje) tradiční pro svou dostupnost [65]. Z metod je třeba zmínit tradiční metody jako příprava čaje, odvaru, macerace za studena, příprava tinktur, stejně jako moderní extrakce separačními technikami jako Soxhletova extrakce, superkritická fluidní extrakce (SFE), superkritická extrakce vodou (SWE), extrakce v ultrazvukové lázni (US), mikrovlnná extrakce bez rozpouštědla, extrakce vysokým

hydrostatickým tlakem (HHP), enzymem asistovaná extrakce či preparativní kapalinová chromatografie, jež ovšem vyžadují náročnější a nákladnější instrumentaci [61, 66].

3.2 Testování biologické aktivity

Biologická aktivita jednotlivých látek či směsných extraktů se obvykle posuzuje v první fázi na sérii *in vitro* testů, které jsou vybírány dle očekávaných výstupů konkrétního zdroje účinných látek. Vodítkem k výběru vhodných metod může být etnobotanická informace získaná díky tradičnímu použití rostliny v lidovém léčitelství [67]. V předkládané práci byla pozornost zaměřena jak na posouzení pozitivního vlivu rostlinného extraktu na lidské zdraví v oblasti prevence civilizačních chorob, tak i na možný přínos pro bezpečnost a trvanlivost potravinářského produktu. Z tohoto důvodu je nutno zastoupit několik metodik zkoumající antimikrobiální, antioxidační, protizánětlivou a protinádorovou aktivitu, a také ověřit možný toxický efekt, který by mohl být překážkou v aplikaci extraktů do potravin.

3.2.1 Antimikrobiální aktivita

Mikroorganismy doprovázejí celý proces cesty potravin až na stůl spotřebitele a mohou je kontaminovat různými způsoby, od zalévání plodiny, přes sklizeň, transport, zpracování, až po výrobu finálního produktu a jeho balení. Kontaminace mikroorganismy představuje dva hlavní problémy: (a) riziko pro lidské zdraví, pramenící z potravinových patogenů a (b) ekonomické ztráty, způsobené znehodnocením kontaminované potravin. Z těchto důvodů hraje antimikrobiální látka jak roli v potravinové bezpečnosti (kontrola a eliminace kontaminace mikroorganismy, včetně patogenů), tak při konzervaci potravin (předcházení přirozeného znehodnocení potravin). V budoucnu se bude na trhu zřejmě objevovat čím dál menší množství syntetických antimikrobiálních látek z důvodů striktních požadavků mezinárodních kontrolních úřadů. Naopak příležitost zde roste pro přírodní látky s antimikrobiální aktivitou, které vykazují v porovnání se syntetickými sloučeninami minimální nebo žádnou toxicitu, absenci nežádoucích účinků a nízký výskyt rezistence mikroorganismů vůči nim [68]. Také spotřebitelé dávají přednost přírodním přídatným látkám před syntetickými a do značné míry tak ovlivňují výběr antimikrobiálních látek výrobcem.

Rostliny jsou bohatým zdrojem sekundárních metabolitů s antimikrobiální aktivitou, mezi něž patří alkaloidy, terpenoidy, saponiny, trísloviny a fenolické

látky [69]. Tyto látky působí na několika různých úrovních: narušením buněčné stěny či membrány, nebo změnou její permeability, inhibicí enzymů DNA v membráně, poškozením proteinů, a dalších složek [70]. Nejvýznamnějšími přírodními extrakty používanými jako antimikrobiální agens do potravin (mořské plody, sušenky, masné výrobky či pekárenské produkty) jsou extrakty esenciálních olejů, koření, fenolických látek nebo vodné extrakty. Často používanou primární surovinou pro extrakci je česnek, zelený čaj, máta, hroznová semínka, koriandr, či tymián [71].

K eliminaci kontaminace mikroorganismy se v potravinářství používá mnoho technik, od konzervace vysokými či nízkými teplotami, přes použití záření, až po moderní vystavení potravin studené plazmě [72] či vysokému tlaku (paskalizace). Vzhledem k požadavkům spotřebitelů na zachování sensorických, nutričních a biologických funkcí potravin zůstávají přídatné látky s antimikrobiálním účinkem i nadále zásadními cestami šetrné konzervace. Cílem je buď potlačit jejich růst (např. u bakterií bakteriostatický účinek), nebo lépe jej zcela zastavit (baktericidní účinek).

Mezi mikroorganismy znehodnocující potraviny patří bakterie, plísně a kvasinky. V potravinovém průmyslu se zejména sleduje výskyt bakterií rodů *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas* a *Salmonella*, dále plísní rodu *Aspergillus*, *Fusarium* a *Penicillium* a kvasinky rodu *Candida* a *Saccharomyces* [73]. Určité druhy bakterií tvoří velmi odolné spory, které odolávají i vysoké teplotě. Některé druhy jsou v určitých potravinách žádoucí a velmi žádané. Jedná se zejména o bakterie mléčného a octového kvašení (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*). Jiné se do potravin přidávají záměrně k jejich obohacení a pozitivnímu vlivu na zdraví konzumenta (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) [74]. U takových potravin je pak důležité zachovat obohacující druhy a zároveň potlačit nežádoucí druhy mikroorganismů, což musí být bráno v potaz již při vývoji nové funkční potraviny pomocí selektivních antimikrobiálních testů.

3.2.2 Antioxidační aktivita

Antioxidanty jsou látky, které mají schopnost neutralizovat reaktivní formy kyslíku (ROS) nebo reaktivní formy dusíku (RNS), ať už agresivní volné radikály nebo látky neradikálové povahy. V těle mají jak fyziologický, tak patologický význam. V lidském organismu jsou volné radikály běžné produkty metabolismu a tělo si s jejich regulací poradí pomocí endogenních antioxidačních systémů enzymové (např. superoxiddismutasa, katalasa) či

neenzymové povahy (glutathion, tokoferoly, askorbová kyselina). Neutralizací volných radikálů pomocí přenosu vlastního elektronu tak antioxidanty ukončují řetězovou reakci tvorby radikálů, jelikož jsou stabilní v obou formách, před i po odevzdání elektronu [75].

Pokud ovšem výskyt ROS a RNS v těle naroste díky nezdravému způsobu stravy a životnímu stylu (kouření, malá fyzická aktivita, strava chudá na biologicky aktivní látky, atd.) a převýší možnosti endogenní regulace, nastává v organismu tzv. „oxidační stres“. Ten vede často ke kaskádě poškození buněčných struktur a tkání a vývoji zejména chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, diabetes, neurodegenerativní změny, rakovina; předčasné stárnutí [76].

Obvyklými terči ROS a RNS jsou lipidy, cukry, proteiny, deoxyribonukleová kyselina. Pokud endogenní systém již nezvládá neutralizovat vysoké množství ROS a RNS, je nutno dodat exogenní antioxidanty, jež mohou být absorbovány ze stravy na ně bohaté. Mezi rostlinné zdroje bohaté na antioxidanty tradičně řadíme zeleninu, ovoce a léčivé rostliny, které obsahují tisíce sloučenin s antioxidační kapacitou. Jsou to polyfenoly, karotenoidy, tokoferoly, askorbová kyselina, minerály atd.

Askorbová kyselina (vitamín C) je bezesporu veřejně nejznámější antioxidant, nicméně studie antioxidační aktivity ovoce naznačují, že hlavním zdrojem antioxidační kapacity není vitamín C, ale většinou jiné fytochemikálie, a to fenolické látky, jako flavonoidy nebo anthokyany [77].

Mechanismus antioxidačního účinku je velmi komplexní děj zahrnující množství reakcí uvnitř živého organismu. K nejvýznamnějším patří neutralizace lipidové peroxidace, při které molekula antioxidantu stabilizuje volný radikál, jenž atakuje lipidy v buněčné membráně [4]. Tato vlastnost je velmi přínosná nejen z pohledu prevence zdraví, ale také z pohledu potravinářského. Oxidace je jeden z procesů mající za následek znehodnocení potravin při skladování. Přídavek antioxidačního rostlinného extraktu ve výrobku tak může bránit nežádoucí peroxidaci lipidů a oxidaci jiných molekul, a tím prodloužit dobu trvanlivosti. V Evropské unii je povolen zatím jediný standardizovaný extrakt rozmarýnu (E392) pro použití v potravinářství. Nicméně existuje množství jiných extraktů (např. skořicový, oregánový, hřebíčkový, hroznový či grapefruitový), které v řadě vědeckých studií

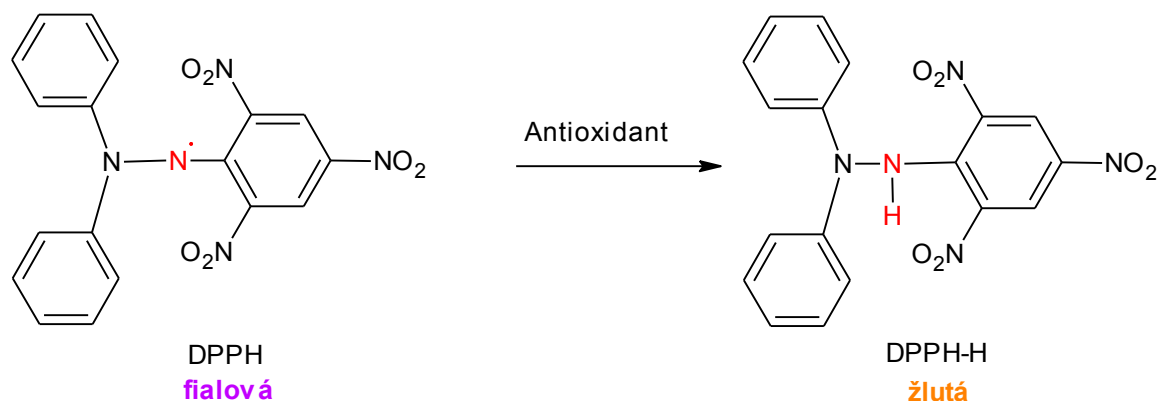
potvrdily antioxidační aktivitu v potravinářských výrobcích, jako jsou maso, sýr nebo sušenky [1].

Při testování antioxidační aktivity směsí z oblasti potravinářství se pro snadnější kvantitativní porovnání používá často pojem celková antioxidační aktivita TAA (Total Antioxidant Activity), reflektující jejich schopnost neutralizace volných radikálů. Pro tyto účely bývají nejčastěji zvoleny metody FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) a TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Power). Nízkomolekulární látky mohou působit antioxidačně několika různými mechanismy, obvykle to bývá eliminace volných radikálů vychytáváním či zhášením, např. u metod DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl test), ORAC, TEAC, TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Species) nebo se uplatňuje redoxně oxidační vlastnosti látek v systému s přechodnými kovy, kdy antioxidant vystupuje jako redukční činidlo (FRAP, cyklická voltametrie) [78]. V zahraniční literatuře se obvykle metody dělí z hlediska reakčního mechanismu na HAT (Hydrogen Atom Transfer) a SET (Single Electron Transfer) metody. U metody HAT je volný radikál vychytáván pomocí přenosu atomu vodíku, reakce nezávisí na pH a je rychlá. U SET metody dochází k přímé redukci přenosem elektronu z antioxidantu, závisí na ionizační energii funkčních skupin a je závislá na pH (ionizační energie klesá úměrně s rostoucím pH). U některých metod se uplatňují obě formy přenosu, např. u metody DPPH [79].

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl Assay)

Tato metoda patří pro svou jednoduchost a minimum instrumentace k nejoblíbenějším v oblasti zkoumání antioxidačního účinku jak individuálních látek, tak celých biologických směsí. Při zhášení radikálu se uplatňuje jak vychytávání radikálů pomocí přenosu atomu vodíku (HAT princip), tak i přímá redukce přenosem elektronu (SET princip). Využívá fialově zbarveného syntetického stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu, který se redukuje na žlutý difenylpikrylhydrazin, viz obrázek 4. Odštěpením atomu vodíku z antioxidantu a přenosem na radikál DPPH• vzniká z antioxidantu semichinon (aroxylový radikál), který se pomocí další molekuly DPPH• oxiduje na chinon. Stupeň oxidace antioxidantu je důležitým parametrem schopnosti zhášet jednu nebo i více molekul radikálu. Reakce se vyhodnocuje spektrofotometricky při 517 nm, obvykle po inkubaci za laboratorní teploty v temnu, nebo může být provedena i v kinetickém modelu. Nevýhodou může

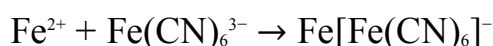
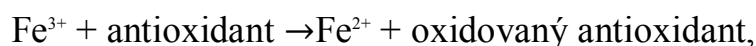
být interference zabarvení extraktu, kryjící se s absorpčním maximem produktu reakce. Ta může být částečně eliminována odečtením interference pozadí přípravou koncentrační řady bez obsahu DPPH. Výsledky se obvykle udávají v ekvivalentech standardu Trolox a aktivita je vyjádřena jako IC_{50} , čili hodnota, při které dojde k 50% zhášení radikálu [80].



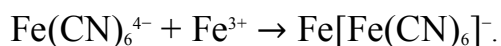
Obrázek 4: Reakční mechanismus zhášení radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) antioxidantem a typická změna barvy (detekce při 517 nm).

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Jedná se o typickou redoxní SET metodu, jež byla původně vyvinuta jako robustní, senzitivní a rychlá metoda k měření proteinů v krevní plazmě. Redukující schopnost metody je charakterizována redukcí železitého iontu Fe^{3+} na železnatý Fe^{2+} v komplexu. Nevýhodou bylo původní použití tripyridyltriazinového komplexu (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin) při nefyziologicky nízkém pH 3,6, vyžadovaném kvůli přítomnosti hydrolyzované formy Fe^{3+} , které mělo za následek pomalé reakce např. polyfenolických látek a thiolů s komplexem a jejich absence na celkovém antioxidačním účinku [78]. V modifikované metodě navržené Berkerem [81] byl použit fosfátový pufr (pH 6,6) pro reakci s antioxidantem, následovaný okyslením prostředí pro vývoj barvy. Tripyridyltriazinový komplex byl nahrazen $K_3(CN)_6$, díky čemuž se v systému uplatní hned dvě reakce:



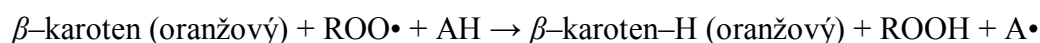
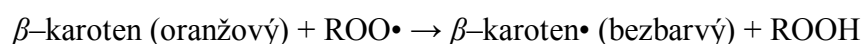
nebo



Výsledným produktem je v obou případech pruská modř, $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Tato reakce je doprovázena změnou barvy ze žluté na zelenomodrou a je detekována spektrofotometricky při 690 nm. Díky stabilizaci produktu redukce $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ pomocí přítomného Fe^{3+} je redoxní potenciál reakčního činidla přesunut od 0,36 V samotného $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ na 0,77 V (je dán dvojicí $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$). Tato hodnota je vyžadovaná většinou u fyziologicky významných neenzymatických antioxidantů fungujících na principu SET (přenosu elektronu).

BCA (β -carotene Bleaching Assay)

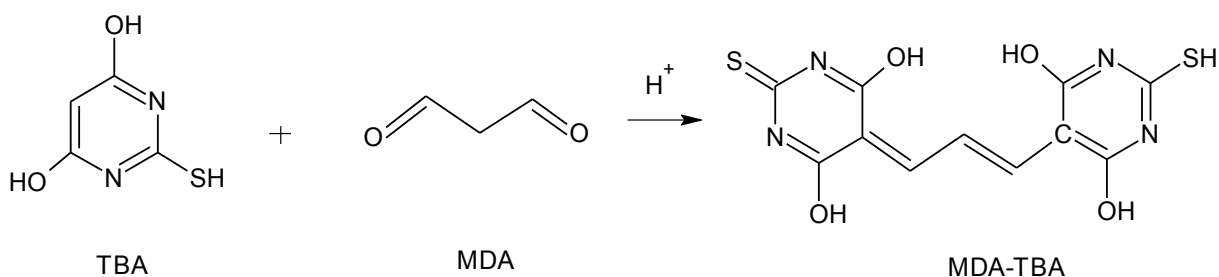
Antioxidační aktivita v této HAT metodě je měřena spřaženou reakcí β -karotenu a linolové kyseliny. Při zahřátí vznikají peroxidací linolové kyseliny v přítomnosti vzdušného kyslíku volné radikály linoleátu, jež napadají dvojně vazby β -karotenu, a zapříčiňují jeho odbarvení.



Sledovaným parametrem je tedy prevence odbarvování β -karotenu v důsledku inhibice radikálů linoleátu antioxidantem z extraktu, jež se sleduje spektrofotometricky při 470 nm před nastartováním reakce a 2 hodiny poté vůči kontrole bez přítomnosti antioxidantu [78, 82].

TBARS (Thiobarbituric acid Reactive Substances)

Tato metoda využívá malondialdehyd jako biomarker peroxidace lipidů. Stupeň lipidové peroxidace může být určen produkty oxidace, jež reagují v přítomnosti H^+ iontů s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) za vzniku růžově zbarvených aduktů (MDA–TBA), jak je nastíněno na obrázku 5. Tyto adukty jsou souhrnně označovány jako reaktivní uhlikaté sloučeniny barbiturové kyseliny (TBARS), jelikož některé uhlikaté sloučeniny také reagují s TBA za vzniku těchto aduktů. Reakční směs je oxidována přidávkem iontu kovu (železa či mědi), načež antioxidant zastaví tvorbu aduktů MDA–TBA a vznik růžového zbarvení reakční směsi [82, 83].



Obrázek 5: Princip tvorby chromogenního aduktu v TBARS metodě.

3.2.3 Protizánětlivá aktivita

Nedávné studie potvrzují vztah mezi antioxidačním účinkem rostlinných extraktů a jejich protizánětlivým působením. Rostliny s vyšším obsahem antioxidantů fenolické povahy vykazují lepší schopnost inhibovat produkci oxidu dusnatého (NO) při zánětlivých procesech [84]. Zejména karotenoidy a flavonoidy jsou schopny potlačit zánětlivé procesy v těle. Dieta bohatá na ovoce, zeleninu a další zdroje bioaktivních látek je obecně doporučována jako prevence snižující riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny [85].

Mechanismus vzniku zánětu je do jisté míry spojován právě s uvolněním reaktivních forem kyslíku (ROS) z aktivovaných neutrofilů a makrofágů. ROS vyvolávají zánět stimulací uvolňování mediátorů zánětu (NO a cytokiny). Endogenní volný radikál NO je intercelulárním mediátorem produkovaným savčími buňkami z L-argininu třemi formami NO synthasy, a to konstituční (cNOS), endoteliální (eNOS) a indukibilní NO synthasa (iNOS) [86]. Za normálních fyziologických podmínek hraje NO roli v regulaci fyziologických procesů (např. komunikaci neuronů, vazodilataci). Oxid dusnatý (NO), superoxid (O_2^-) a jejich reakční produkt peroxynitrit ($ONOO^-$) jsou ve zvýšeném množství produkovány při odpovědi organismu na bakteriální a virovou infekci a mohou přispívat ke zvyšování oxidačního stresu, poškození tkáně či vzniku rakoviny a mnoha dalším chronickým problémům jako ateroskleróza, hypertenze, Alzheimerova nemoc, diabetes, kardiovaskulární onemocnění a chronický zánět [87, 88].

In vitro testování inhibice NO produkce makrofágy je tudíž významnou metodou. Stanovení probíhá na makrofágových buněčných liniích v přítomnosti lipopolysacharidu (LPS), jenž stimuluje receptory makrofágů. Lipopolysacharid, složka buněčné stěny gramnegativních bakterií, je jedním

z nejsilnějších aktivátorů makrofágů a provokuje produkci cytokinů uplatňujících se v zánětu [89]. V přítomnosti kyslíku ve vodném roztoku podléhá vznikající NO rychlé autooxidaci na dusitany (NO^{2-}). Griessovou metodou lze spektrofotometricky stanovit množství dusitanů pomocí dvou spřažených reakcí. Sulfanylamid (4-aminobenzensulfanylamid) se v přítomnosti dusitanů převede diazotací na diazoniovou sůl a následnou kopulací s N-(1-naftyl)-1,2-ethyldiaminem vznikne růžové azobarvivo měřitelné při 540 nm [90].

3.2.4 Antikarcinogenní aktivita

Rakovina patří celosvětově spolu s nemocemi oběhového systému k nejčastějším příčinám úmrtí. V rámci Evropské unie (EU) dosáhl v roce 2013 počet úmrtí 250 000, přičemž jednu pětinu představovala rakovina plic, následována rakovinou tlustého střeva a konečníku a rakovinou prsu [91]. Česká republika se bohužel drží konstantně mezi horní desítkou zemí v EU. V roce 2015 (poslední dostupná data) zapříčinily zhoubné novotvary úmrtí 26,5 tisíce osob. Nejčastěji populaci postihuje rakovina tlustého střeva a konečníku, prostaty, prsu a plic [92].

K hodnocení protinádorového účinku se používají *in vitro* metody s buněčnými kulturami, jako jsou např. HeLa (karcinom děložního čípku), HepG2 (karcinom jater), MCF-7 (adenokarcinom prsu) a NCI-H460 (nemalobuněčný karcinom plic). Jedná se o rakovinotvorné buňky izolované primárně z lidského nádoru a kultivované v buněčných liniích. Obvykle potřebují k růstu pevný podklad, pak mluvíme o přisedlých (adherentních) buněčných kulturách. Ke kultivaci je nutné médium, které je zapotřebí periodicky obměňovat z důvodu hromadění odpadních látek z buněk.

Základní kultivační média MEM (minimální esenciální médium) mohou být modifikována a obohacena o různé látky, tzv. suplementy (antibiotika, aminokyseliny, cukry, sérum). Mezi takové patří DMEM (Dulbeccovo minimální esenciální médium) s glukózou a L-glutaminem a fetálním hovězím sérem bohatým na růstové hormony. Jakmile buněčná linie dosáhne konfluence (maxima logaritmické fáze růstu, kdy vytvoří monovrstvu a dojde k tzv. kontaktní inhibici), je třeba buňky pasážovat (přenést) do nové kultivační nádoby. Adherentní buňky je nejprve nutno uvolnit do suspenze pomocí trypsinu. K detekci proliferace se používá několik metod, mezi které patří i moderní nepřímá metoda barvení sulforhodaminem B. Toto světle růžové

aminoxanthenové barvivo se váže na proteiny živých buněk. Detekce probíhá spektrofotometricky při 515 nm [93].

3.2.5 Cytotoxicita

Současná legislativa vyžaduje před schválením nové látky, ať už v potravinovém, kosmetickém či farmaceutickém průmyslu, stanovení její toxicity. Proto se neustále vyvíjejí nové metody, které by alespoň v prvních fázích testování nahradily nákladné modely s pokusnými zvířaty a byly schopny poskytnout spolehlivé informace i při testování velkého počtu látek v malých množstvích.

Při testování akutní toxicity jak přírodních, tak chemických látek nyní hrají nezastupitelnou roli *in vitro* metody používající buněčné kultury, které se snaží být alternativou k testování xenobiotik (cizorodých látek) na pokusných organismech. Buněčné kultury mohou být rostlinného, živočišného nebo lidského původu. Primární zdravé buňky se považují (na rozdíl od transformovaných buněčných linií, zmíněných v předchozí kapitole) za ideální modelový systém predikce akutní toxicity zkoumaných látek. Nicméně kvůli jejich omezené životnosti je nutná izolace čerstvé dávky buněk pro každé testování. Z toho důvodu je použití lidských buněk komplikované a často se jako nejpříbuznější model používají buňky např. z vepřových jater (např. PLP2). Jaterní buňky jsou v těle zodpovědné za detoxikaci xenobiotik, a jsou proto velmi citlivé vůči akutnímu poškození. Toxicita se stanovuje na základě poškození základních funkcí buněk. Obvykle se posuzují parametry jako buněčná aktivita, membránová integrita a viabilita buněk. K vyhodnocení se používají metody průtokové cytometrie, fluorescenční mikroskopie či spektrofotometrie. Mezi nejrozšířenější metody pak patří test integrity membrány trypanovou modří, test aktivity mitochondriálních dehydrogenáz pomocí MTT testu (s 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl] -2,5-difenyloxy-2H-tetrazolium bromidem), test funkce lysozomů neutrální červení či test celkového obsahu proteinů sulforhodaminem B [94].

3.3 Metody identifikace biologicky aktivních látek v extraktech

Rostlinné extrakty jsou komplexní směsi mnoha biologicky aktivních látek zastoupených ve vzorku v různém množství. Pro lepší pochopení původu biologické aktivity je nutné stanovit přítomnost a kvantitu látky, u nichž již byla aktivita testována. Obzvláště v případech, kdy není esenciální izolace

aktivních látek, jsou metody jako LC–MS (kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií) důležitou pomůckou k charakterizaci komplexních matic. Instrumentální metody poskytují informace potřebné k identifikaci a kvantifikaci obsažených látek, aby bylo možno například standardizovat extrakt k jeho využití v potravinářství.

3.3.1 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je separační metoda, jejímž účelem je rozdělení směsi látek na základě jejich rozdílného fyzikálně chemického chování v soustavě dvou fází. U separovaných látek dochází při dělení k opakovanému vytváření rovnovážných stavů mezi mobilní a stacionární fází. Látky unášené mobilní fází jsou díky interakcím se stacionární fází (např. vodíková vazba, van der Waalovy síly, hydrofilní nebo lipofilní síly) zadržovány v systému a eluovány různou rychlostí. Výstupní charakteristika je chromatogram odezvy rozdělených látek v podobě píků, z něhož lze určit pro látku typický retenční čas (doba zadržení v systému) a kvantitu látky (výška píku a/nebo plocha pod píkem).

Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) a modernější ultra-vysokotlaká účinná kapalinová chromatografie (UPLC) přinesly pak výrazné zrychlení separace, snížení spotřebované mobilní fáze a zvýšení separační účinnosti. K rozdělování vzorku dochází v koloně s vhodnou stacionární fází. Ta by měla být zvolena vzhledem k fyzikálně chemickým vlastnostem vzorku a zvolené mobilní fázi. V dnešní době se dává přednost tzv. reverzním fázím, kdy stacionární fáze je nepolární, jelikož vzorek vyžaduje použití polární mobilní fáze. Nejběžnějším detektorem pro LC je UV–VIS spektrofotometr, fluorimetr, refraktrometr nebo dnes čím dál častěji uplatňovaný hmotnostní spektrometr [95].

3.3.2 Hmotnostní spektrometrie

Tato analytická metoda slouží k identifikaci látek ve formě iontů dle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Přístroj poskytuje informace jak kvalitativní (určení M_r , strukturní charakteristika), tak kvantitativní informaci o analyzovaných látkách (odezva je přímo úměrná koncentraci látky ve vzorku). Výstupem je graf závislosti intenzity odezvy iontů na jejich m/z , nazývaný hmotnostní spektrum. Základními prvky spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Díky iontovému zdroji jsou převedeny neutrální molekuly na nabitě částice, které získají nadbytek vnitřní energie nutné pro

další typickou fragmentaci molekulového iontu. Dle míry dodané energie rozlišujeme tvrdé a měkké ionizační techniky. Ionizace probíhá buď za sníženého tlaku, např. metody EI (Electron Ionisation), CI (Chemical ionisation) nebo MALDI (Matrix-Assisted Laser Ionisation) či za atmosférického tlaku u metod ESI (Electron Spray Ionisation), APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) a APPI (Atmospheric Pressure Photoionisation). Pro spojení LC-MS jsou ideální použití atmosférického tlaku a 80 % těchto komerčních systémů používá ionizaci elektrosprejem (ESI), která je vhodná pro látky středně polární až iontové (pro nepolární a labilní látky je vhodnější APPI). K ionizaci dochází pomocí elektronového spreje za tvorby molekulárních a aduktových iontů. Fragmentové ionty nejsou v této měkké a šetrné ionizaci patrné, jelikož se tvoří pouze ve velmi omezeném množství.

K modernějším měkkým ionizačním technikám patří DART (Direct Analysis in Real Time), která sice využívá běžných principů ionizace (ESI, APCI, APPI), ale v otevřeném prostoru mimo zdroj, a je tedy možné analyzovat i rozměrné a nestandardní vzorky v plynném, kapalném i pevném skupenství. Příprava vzorku je tudíž minimální. S analytem interagují excitované částice reakčního plynu (helium) a ionty jsou zachyceny na protielektrodě. Obvykle dochází k vzniku iontů se sudým počtem elektronů, jako u ostatních měkkých metod za atmosférického tlaku.

V hmotnostním analyzátoru se ve vysokém vakuu dělí vzniklé ionty na základě různých fyzikálních principů. U kvadrupolu a iontové pasti je to pomocí různé stability oscilací iontů v 2D nebo 3D kombinaci stejnosměrného a střídavého napětí, u Orbitrapu (elektrostatická orbitální past) pak díky různé frekvenci harmonických oscilací v analyzátoru. Po rozdělení v analyzátoru dopadají ionty na detektor generující signál indukci proudu nebo tvorbou sekundárních elektronů a jejich zesílení (elektronový násobič, fotonásobič, Faradayova klec). Klíčovým předpokladem analýzy i detekce je vysoké vakuum, které zaručuje dostatečnou střední dobu letu iontů a minimalizuje možnost jejich kolize s neutrálními atomy.

Orbitrap patří k nejnovějším typům analyzátoru. Skládá se ze dvou elektrod s vloženým napětím. Ionty se pohybují okolo a podél středové elektrody a na vnějších elektrodách je měřen proud indukovaný ionty. Vstupující svazek iontů o různé m/z je stlačován zvyšujícím se napětím a po jeho stabilizaci vytvoří pomocí úhlového rozšíření prstence iontů kolem středové elektrody. Pomocí

Fourierovy transformace jsou pak frekvence oscilací každého prstence stanoveny na vnějších elektrodách.

Vyřešení potřeby fragmentace molekulárního iontu na typické fragmenty, které by umožnily rozlišení látek se stejným m/z , poskytlo tandemové spojení analyzátorů, např. tří kvadrupólů v řadě za sebou, přičemž prostřední slouží jako kolizní cela, kde se v kolizním plynu excitují vybrané ionty, a ty se dále fragmentují [96].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Následující kapitola shrnuje konkrétní postup a instrumentaci metod použitých v této disertační práci ke studiu biologicky aktivního účinku sloučenin a jejich identifikaci v získané matici rostlinného extraktu.

4.1 Chemikálie a materiál

Acetonitril 99.9% v HPLC kvalitě (Fisher Scientific, Lisabon, Portugalsko), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), β -karoten a elipticin, kyselina octová, tris-fosfátový pufr (PBS), sulforhodamin B (SRB), trypanová modř, trichloroctová kyselina (TCA), Tris-(hydroxymetyl)aminometan (TRIS) a lipopolysacharid (LPS) byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Standardy fenolických sloučenin pocházejí od dodavatele Extrasynthèse (Genay, Francie). DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) byl zakoupen u Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). Dulbeccovo Modifikované Eagle's médium (DMEM) a RPMI-1640 médium, Fetální hovězí sérum (FBS), Hankův vyvážený solný roztok (Hank's balanced salt solution, HBSS), L-glutamin, roztok neesenciální aminokyselin (2 mM), roztok penicillin/streptomycin (100 U/mL and 100 mg/ml, respektive), a trypsin-EDTA (etylendiamintetraoctová kyselina) jsou od firmy Hyclone (Logan, UT, USA). Griessovo činidlo bylo zakoupeno u Promega Corporation (Madison, WI, USA). Kultivační média Muller Hinton bujón (MHB) a Tryptic Soy bujón (TSB) pocházejí od Biomerieux (Marcy l'Etoile, Francie), stejně jako krevní agar s přidavkem ovčí krve (7%) a Mac Conkey agarové plotny. Činidlo *p*-jodonitrotetrazolium chlorid (INT) je od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bylo použito jako indikátor bakteriálního nárůstu. Všechny ostatní chemikálie byly analytické kvality a získány u obvyklých dodavatelů. Voda byla purifikována pomocí systému Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, SC, USA).

4.2 Původ a příprava rostlinného materiálu

Rostliny *Solanum stramonifolium* Jacq. (stonek, listy, kořeny a plody) a *Momordica charantia* L. (nadzemní část) byly vybrány na základě konzultace s místními léčiteli a botaniky a posléze sklizeny z volné přírody v oblasti Santa Cruz, Trinidad a Tobago pod dohledem Dr. Simone Walcott, která také provedla botanické určení a přípravu herbářových položek TRIN 40645 a TRIN 40646, jež jsou uloženy v Botanické zahradě University West Indies, St. Augustine, Trinidad.

Jednotlivé vzorky rostlinného materiálu byly omyty čistou vodou, odděleně usušeny na vzduchu v dobře větrané místnosti a posléze pomlety na laboratorním mlýnku Grindomix GM 200 (Retsch, Haan, Německo). Homogenizovaný prášek byl separován přes sítko vel. 20 a z každého vzorku bylo 5 g extrahováno ve 100 ml rozpouštědla ethanol/voda (80:20, v/v) po dobu 1 h za stálého míchání (150 rpm). Extrakt byl poté odfiltrován (filtrační papír Whatman č. 4) a pevný zbytek znovu extrahován za stejných podmínek. Spojené supernatanty byly následně odpařeny za vakua při 40 °C (Büchi 116 R-210, Flawil, Švýcarsko). Zbylá vodní frakce byla lyofilizována (FreeZone 4.5 model 117 7750031, Labconco, KS, USA). Získaný prášek byl homogenizován

a skladován v temnu při -20 °C [97]. Před stanovením biologické aktivity byly vzorky dezinfikovány pomocí UV záření při 258 nm (UV-C Long Life 30W/G30TB, Phillips, Holandsko).

4.3 Testy biologické aktivity

Samotné testy probíhaly díky spolupráci na několika institucích s ohledem na potřebu zajistit komplexní sadu vlastností u zkoumaných extraktů tak, aby bylo možno ji srovnat s jinými zdroji. Proto metodika vychází z validovaných metod a standardních postupů a její razantní úpravy nebyly cílem této práce.

4.3.1 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita byla stanovena mikrodiluční bujonovou metodou v mikrotitračních destičkách [98, 99].

Příprava zásobního roztoku extraktu

Zásobní roztok extraktu byl připraven nejprve v dimethylsulfoxidu (DMSO) a posléze rozpuštěn v odpovídajícím kultivačním médiu (výsledný objem DMSO max 0,5 %) dle požadavků mikroorganismu a pipetován na požadovanou koncentrační řadu. Koncentrace zásobního roztoku pro klinické izoláty byla 20 mg/ml.

Přívraha kultivačních půd

V tabulce 6 je uveden seznam kultivačních půd pro jednotlivé mikroorganismy. Prášková půda byla po navážce dle instrukcí u jednotlivých výrobků rozpuštěna v odpovídajícím množství destilované vody. Lahve s bujóny byly poté sterilizovány v autoklávu při 121 ± 2 °C po dobu 15 minut. Použito bylo tekuté médium čili bujón Mueller-Hinton (MH) a Tryptic Soy bujón (TSB)

Tabulka 6 Kultivační podmínky mikroorganismů

Mikroorganismus	Živná půda	Typ půdy	Teplota kultivace	Doba kultivace	Další podmínky
klinické izoláty	MH	bujón	37 °C	24h	A+
klinický izolát <i>Enterococcus faecalis</i>	TSB	bujón	37 °C	24h	A+

Příprava inokula

Kultury byly oživeny ze zamrazených vzorků asepticky inokulací 500 µl do 5 ml příslušného bujónového média. Po homogenizaci na vortexu byl inokulát kultivován dle daných podmínek dle mikroorganismu.

Ve spolupráci s Instituto Politecnico de Bragança (Portugalsko) byly testům podrobeny klinické izoláty včetně multiresistentních kmenů, viz tabulka 7.

Tabulka 7 Izoláty oportunních lidských patogenů

Odběr	Mikroorganismus	Klasifikace dle Grama
sputum	<i>Acinetobacter baumannii</i>	G–
moč	<i>Enterococcus faecalis</i>	G+
moč	<i>Escherichia coli</i>	G–
moč	<i>Escherichia coli</i> ESBL	G–
moč	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	G–
moč	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	G–
mozkomíšní mok	<i>Listeria monocytogenes</i>	G–
sputum	methicilin-resistantní <i>Staphylococcus aureus</i>	G+
stěr z rány	methicilin-senzitivní <i>Staphylococcus aureus</i>	G+
sputum	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	G–

ESBL = producenti širokospektrých β -laktamáz;

Klinické izoláty byly získány z odběrů u pacientů na Okresní klinice Bragança a v nemocnici Centre of Trás-os-Montes a Alto-Douro-Vila Real, Portugalsko. Čtyři gram pozitivní bakterie a šest gram negativních bakterií bylo

identifikováno mikrodiluční metodou na destičkách MicroScan panels (MicroScan®; Siemens Medical Solutions Diagnostics, West Sacramento, CA, USA).

Zároveň byl proveden test citlivosti vůči sérii antibiotik s použitím stejné metodiky a vyhodnocen dle Klinických breakpointů vydaných Ústavem pro klinickou a laboratorní standardizaci [100] a Evropskou komisí pro testování antimikrobiální citlivosti.[98]

Testováno bylo koncentrační rozmezí 20 – 0,313 mg/ml jednotlivých extraktů. Zásobní roztok extraktu byl připraven nejprve v dimethylsulfoxidu (DMSO) a posléze rozpuštěn v odpovídajícím kultivačním médiu (výsledný objem DMSO max 0,5 %) dle požadavků mikroorganismu a pipetován na požadovanou koncentrační řadu. Následně byly jamky inokulovány přes noc narostlým čerstvě připraveným standardizovaným inokulem (10^7 CFU/ml, à 5 µl) a destička inkubována po dobu 24 h aerobně při 37 °C. U všech extraktů byla připravena také nezaočkovaná koncentrační řada extraktů k eliminaci vlivu zabarvení na stanovení výsledků. V případě klinických izolátů byla antibiotika vybrána na základě předchozích testů citlivosti kmenů pomocí karet VITEK® 2 Compact AST–N192 a AST–P619 (Biomérieux, Lyon, Francie) [101]. Amikacin (*K. pneumoniae* ESBL and *P. aeruginosa*), tobramycin (*A. baumannii*), amoxicillin (*E. coli* and *K. pneumoniae*), gentamicin (*E. coli* ESBL), ampicillin (*L. monocytogenes*) a vancomycin (*S. aureus*, MRSA, *E. faecalis*, probiotické kmeny) byly použity tudíž jako pozitivní kontrola citlivosti bakterií.

U klinických izolátů byla použita přímá detekce [102] s vyhodnocením pomocí INT barviva (jodonitrotetrazoliová violet'), které poskytuje růžové zabarvení v přítomnosti životaschopných bakterií. Jako MIC byla brána poslední koncentrace, u níž nedošlo po opakované inokulaci za stejných podmínek z hraničních jamek k nárůstu mikroorganismu. Odečet byl proveden vizuálně a hodnoty MIC uvedeny jako mg/ml.

4.3.2 Antioxidační aktivita

Z důvodu různorodosti mechanismů, uplatňujících se při antioxidačních jevech nejen v lidském těle, ale i potravinách, bylo nutno provést sérii metod. Jedině tak lze komplexněji posoudit antioxidační aktivitu hrubého extraktu a jeho příspěvek ze zdravotního i konzervačního hlediska. Celkem byly zvoleny 4 standardně používané metody: DPPH, FRAP, BCA a TBARS. V 80%

ethanolu byla připravena koncentrační řada extraktů (5000-19,5 µg/mL). Jako negativní kontrola v těchto případech sloužil 80% ethanol použitý pro přípravu roztoků extraktů. Pro pozitivní kontrolu a srovnání byl připraven Trolox, syntetický, ve vodě rozpustný analog vitamínu E [103].

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl Assay)

Reakční směs v jamkách mikrotitrační destičky sestávala z 30 µl vzorku a 270 µl čerstvého pracovního roztoku DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu) v methanolu (60 µM). Finální koncentrace extraktu v jamkách byla 500–19,5 µg/mL. Směs byla inkubována 30 min v temnu při laboratorní teplotě. Absorbance byla měřena při 515 nm na mikrotitrační čtečce ELX800 (Bio–Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Antioxidační aktivita zhášení radikálů byla vypočítána jako 50% úbytek absorbance oproti negativní kontrole dle vzorce $[(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{EXTRACT}})/A_{\text{DPPH}}] \times 100$. Výsledky byly vypočteny pomocí programu Excel a jsou uvedeny jako IC₅₀ v µg/ml.

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power; Prussian blue assay)

Jednotlivé roztoky extraktu (0,5 ml od každé koncentrace) byly smíchány s 0,5 ml fosfátového pufru (200 mM, pH 6,6) a 0,5 ml K₃[Fe(CN)₆] (1 % w/v). Směs byla inkubována 20 min při 50 °C a poté bylo přidáno 0,5 ml trichloroctové kyseliny (10 % w/v). Do 48-jamkové destičky bylo odpipetováno 0,8 ml vzorku, přidáno 0,8 ml deionizované vody a 0,16 ml FeCl₃ (0,1 % w/v). Absorbance směsi byla změřena na Multiplate Readeru ELX 800 při 690 nm (Bio-Tek Instruments, Inc; Winooski, VT, USA).

BCA (β-carotene Bleaching Assay)

Inhibice odbarvování β-karotenu v přítomnosti linolové kyseliny byla prováděna na koncentrační řadě extraktů naředěných v 80% ethanolu (20–0,156 mg/ml). Pracovní roztok β-karotenu byl připraven rozpuštěním 2 mg β-karotenu v 10 ml chloroformu. Z tohoto roztoku byly a pipetovány 2 ml do kulaté odpařovací baňky. Chloroform byl vakuově odpařen při 40 °C. Poté bylo pipetováno 40 mg kyseliny linoleové, 400 mg emulgátoru Tween 80 a 100 ml destilované vody. Celou směsí bylo intenzivně třepáno, dokud se emulze nehomogenizovala. Do zkumavek bylo odpipetováno po 4,8 ml emulze a přidáno 0,2 ml od každé koncentrace extraktu ve třech opakováních. Okamžitě byla změřena absorbance směsi v čase $t = 0$ min při 470 nm (Analytikjena 200, Jena, Německo). Poté byly zkumavky inkubovány na

třepačce v lázni (50 °C) po dobu 2 h. Následně byla opět proměřena absorbance vzorků v čase $t=120$ min. Jako negativní kontrola byl použit 80% ethanol s emulzí β -karotenu. Inhibice odbarvování β -karotenu byla vyjádřena jako IC_{50} (v $\mu\text{g/ml}$) odpovídající 50 % úbytku absorbance oproti kontrole dle vzorce $A_{t=120\text{min}} / A_{t=0\text{min}} \times 100$.

TBARS (Thiobarbituric acid Reactive Substances)

Test byl proveden na extraktech ředěných v 80% ethanolu v koncentračním rozmezí 20–0,156 mg/ml. Tkáň z vepřového mozku (*Sus scrofa*) byla oficiálně získána na místních jatkách a homogenizována s ledově vychlazeným Tris-HCl pufrem (20 mM, pH 7,4) v poměru 1:2 (w/v) v Polytronovém homogenizátoru (Kinematica AG, Lucerne, Švýcarsko). Takto získaný homogenát byl centrifugován (3000 g, 10 min). Supernatant (à 100 μl) byl přidán do zkumavek obsahujících 200 μl extraktu se 100 μl FeSO_4 (10 mM) a 100 μl askorbové kyseliny (0,1mM). Směs byla inkubována 1 h při 37 °C ve vodní lázni. Reakce byla zastavena přidáním kyseliny trichloroctové (28 % w/v, 500 μl). Následně byla přidána kyselina thiobarbiturová (2 % w/v, 380 μl) a směs byla zahřívána na vodní lázni dalších 20 min při 80 °C. Vysrážené proteiny byly odstraněny centrifugací (3000 g, 10 min) po dobu 20 min. Absorbance vzniklého barevného komplexu malondialdehydu (MDA-TBA) v supernatantu byla změřena při 532 nm (Analytikjena 200, Jena, Německo). Výsledek byl vyjádřen srovnáním absorbance negativní kontroly bez přítomnosti extraktu ku vzorku a vyjádřen jako IC_{50} v $\mu\text{g/ml}$.

4.3.3 Protizánětlivá aktivita

Extrakty byly testovány pomocí standardní metody s použitím Griessova činidla [104] v koncentračním rozmezí 400 až 25 $\mu\text{g/ml}$ (finální koncentrace v jamkách). Extrakty i lipopolysacharid (LPS) byly rozpuštěny v kultivačním médiu DMEM obohaceném o suplementy.

Příprava buněčné kultury

Buněčná linie myších makrofágů RAW 264.7 byla kultivována v DMEM médiu obohaceném o L-glutamin (2 mM), antibiotika penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) a 10% teplem inaktivovaného zárodečného hovězího séra při 37 °C s 5% CO_2 ve zvlhčované atmosféře.

K určení poměru mrtvých buněk (méně než 5 %) byl proveden test vylučování tropanové modři poté, co byly buňky uvolněny pomocí škrabky. Pro každý test

byla připravena startovací kultura o buněčné hustotě 5×10^5 buněk/ml. Stejněměrné porce čítající 150 000 buněk na jamku byly nanášeny do 96-ti jamkové destičky a ponechány přes noc, aby se uchytily na stěnách jamek. Poté byly buňky 1 hodinu vystaveny přítomnosti testovaného extraktu a následně stimulovány přidávkem LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 18 h. Dexametazon (50 μM) sloužil jako pozitivní kontrola. Negativní kontroly neobsahovaly extrakt ani LPS.

Stanovení oxidu dusnatého (NO)

Reagenční sada s Griessovým činidlem obsahující sulfanilamid, N-(1-naftyl)etylendiamin hydrochlorid (NED) a roztoky dusitanů byla použita k určení tvorby NO. Referenční kalibrační křivka NaNO_2 (100 μM až 1,6 μM ; $y = 0,0066x + 0,1349$; $R^2 = 0,9986$) byla připravena také na mikrotitračních destičkách. Supernatant buněčné kultury (100 μl) byl přenesen na každou destičku a inkubován se sulfanilamidem a NED roztoky při pokojové teplotě po dobu 5 až 10 min. Produkce NO byla měřena jako absorbance při 540 nm (Microplate Reader ELX800 Biotek) a určena z kalibrační křivky referenční sloučeniny. Experimenty byly provedeny ve třech opakováních a výsledky byly vyjádřeny jako hodnoty IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) odpovídající koncentraci vzorku, která poskytuje 50% inhibici produkce oxidu dusnatého (NO), vždy s uvedením střední hodnoty a směrodatné odchylky (SD).

4.3.4 Antikarcinogenní aktivita

Testy byly provedeny pomocí metody s použitím sulforhodaminu B (SRB) na 5 buněčných liniích [105]. Extrakty byly rozpuštěny ve vodě na zásobní roztok (8 mg/ml), ze kterého byla připravena koncentrační řada (400–1,5 $\mu\text{g/ml}$ finální koncentrace) pro *in vitro* testování antiproliferačního efektu vůči 4 vzorkům lidských rakovinných buněčných linií: HeLa (karcinom děložního čípku), HepG2 (karcinom jater), MCF-7 (adenokarcinom prsu) a NCI-H460 (nemalobuněčný karcinom plic). Cytotoxicita byla ověřena na nerakovinotvorné primární buněčné linii PLP2 (vepřová jaterní tkáň). Elipticin byl použit jako pozitivní kontrola.

Buňky byly rutinně udržovány ve formě adhezivních buněčných linií v RPMI-1640 médiu obohaceném o L-glutamin (2 mM), 10% teplem inaktivovaného zárodečného hovězího séra, antibiotika penicilin (100 U/ml) a streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) při 37 °C s 5% CO_2 ve zvlhčovaném vzduchu. Před testem bylo provedeno uvolnění buněk pomocí 1,5 ml TripLE Express reagentu a pomocí centrifugace odděleny od zbytku média. Pomocí 0,4% roztoku tropanové modři

byla zkontrolována viabilita buněk, vypočtena koncentrace buněk v médiu, buňky byly odděleny od starého média a pomocí vypočítaného objemu nového média upraveny na koncentraci odpovídající zásobnímu roztoku 50 000 buněk/ml.

Každá buněčná linie byla nanášena v připravené hustotě do jamek mikrotitrační destičky (10 000 buněk/jamku). Buňky byly inkubovány 24 hodin, aby bylo docíleno adheze na stěnu jamek. Další den byly pipetovány vzorky extraktů (10 μ l) a inkubovány dalších 48 h. Poté byly buňky zafixovány v jamkách pomocí vychlazené 10% kyseliny trichloroctové a inkubovány 60 min při 4°C. Destičky byly následně vymyty deionizovanou vodou a vysušeny fénem. Roztok SRB (0,1 % v 1% octové kyselině) byl přidán do každé jamky (100 μ l) a destičky byly inkubovány 30 min při laboratorní teplotě. Destičky byly vysušeny a zachycený SRB byl rozpuštěn přidavkem 200 μ l TBS (10 mM, pH 7,4). Absorbance byla proměřena při 540 nm na ELX800 čtečce destiček (Bio-Tek Instruments, Inc.; Winooski, VT, USA).

4.3.5 Cytotoxicita

Cytotoxicita vůči nekarcinogenním buňkám byla určena na primární buněčné linii z vepřových jater. Tkáň byla získána z čerstvě poraženého zvířete z lokálních jatek a identifikována jako PLP2. Jaterní tkáň byla promyta Hankovým solným roztokem obsahujícím 100 U/ml penicilinu a 100 μ g/ml streptomycinu a rozdělena do explantátů (cca 1 mm³). Explantáty byly umístěny do tkáňových lahví (25 cm²) s obohaceným DMEM médiem (10% fetální hovězí sérum, 2 mM roztok neesenciálních aminokyselin, 100 U/ml penicilinu a 100 μ g/mL streptomycinu) a inkubovány při 37 °C s 5% CO₂ ve vlhčené atmosféře. Médium bylo měněno každé 2 dny. Kultivace buněk byla kontrolována pod invertovaným fázovým mikroskopem Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments, Amsterdam, Holandsko) každé 2 až 3 dny. Připravená buněčná kultura byla nanášena na mikrotitrační destičku (10 000 buněk/jamku) a kultivována v obohaceném DMEM médiu 24 h. Poté byly buňky na 48 h vystaveny přítomnosti extraktů (příprava viz kapitola 3.3.6) a byla provedena stejná procedura se SRB, jaká byla popsána tamtéž. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnoty IC₅₀ (μ g/ml), což odpovídá koncentraci vzorku inhibujícímu 50 % nárůstu buněk oproti kontrole.

4.4 LC-MS analýza přítomných fenolických látek

Analýza byla provedena ve spolupráci s portugalským pracovištěm Instituto Politecnico de Braganca v Portugalsku [105].

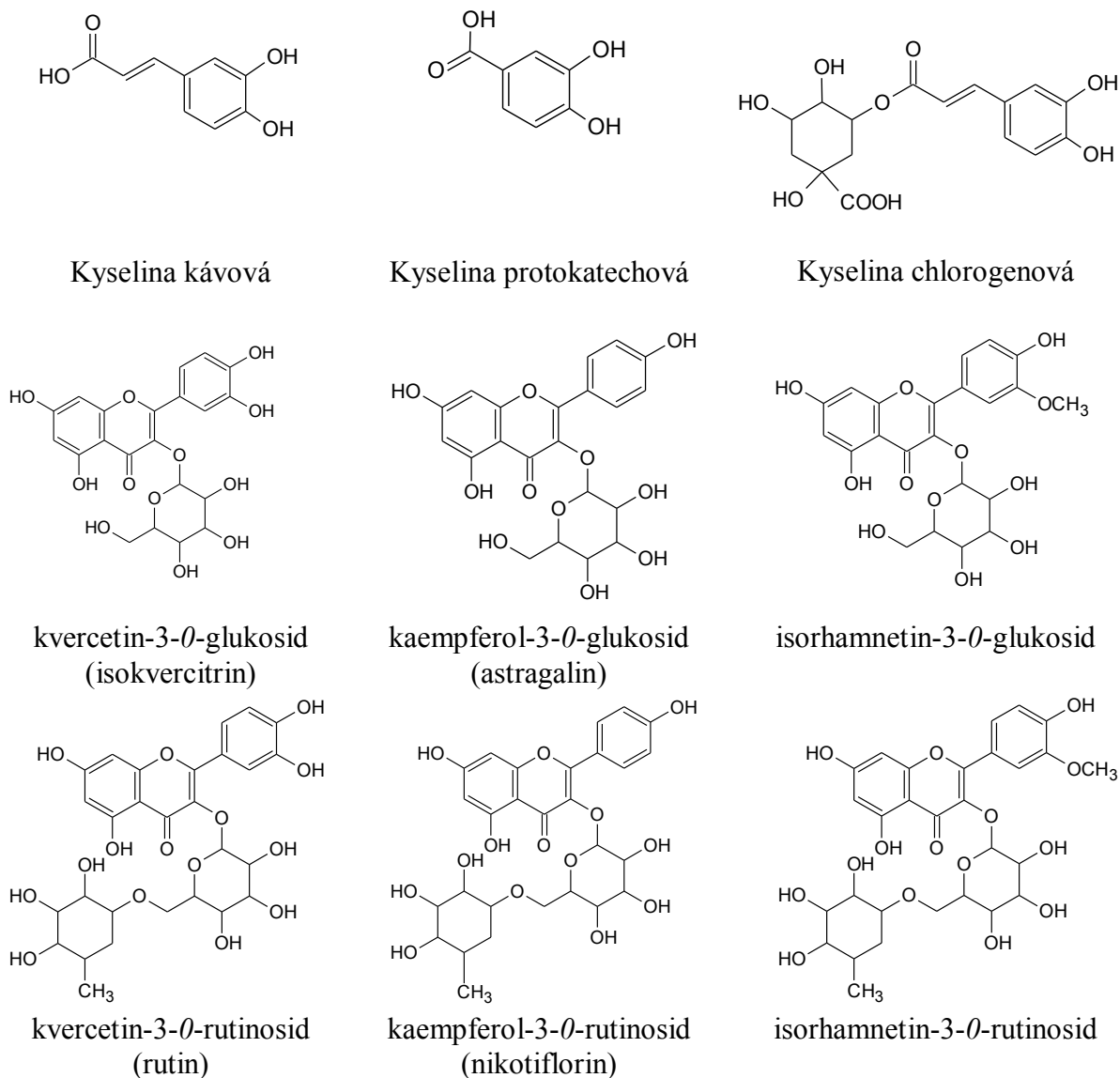
Suché lyofilizované extrakty byly rozpuštěny ve směsi voda/ethanol (80:20, v/v) a posléze přefiltrovány přes 0,22 µm nylonový filtr na požadovanou koncentraci 20 mg/ml. U plodu *S. stramonifolium* bylo nutno provést separaci kvůli přítomnosti cukrů [106]. Z připraveného extraktu byl odpařen ethanol a vodná frakce byla aplikována na kolonku C-18 SepPak® Vac 3 cc (Phenomenex, Torrance, CA, USA), předem aktivovanou ethanolem a vodou. Cukr a polárnější látky byly odstraněny vymytím 10 ml vody, takto přečištěný extrakt byl promyt 5 ml ethanolu a následně odpařen za vakua, znovu rozpuštěn v 1 ml 20% ethanolu a zfiltrován přes 0,22 µm LC nylonový filtr pro HPLC analýzy.

Ke sběru chromatografických dat byl použit kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000 UPLC System (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Ten sestává z kvartérní pumpy, autosampleru (chlazeném na 5 °C), degasseru, automatizované temperované jednotky s kolonou (vyhříváné na 35 °C) a detektoru diodového pole spojeného s hmotnostním spektrometrem (LC-DAD-ESI/MSⁿ).

Chromatografická separace probíhala na koloně Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 (3 µm, 4,6 × 150 mm, Waters, Milford, MA, USA) gradientovou elucí při průtoku 0,5 ml/min s použitím mobilní fáze (A) 0,1% vodný roztok mravenčí kyseliny a (B) acetonitril, a to 15% B (0–5 min), 15–20% B (5–10 min), 20–25% B (10–20 min), 25–35% B (20–30 min), 35–50% B (30–40 min) a regenerací kolony 15% B (po dobu 30 min).

Data byla sbírána současně z DAD detektoru (280 a 370 nm) i z hmotnostního spektrometru (v negativním módu). Hmotnostní spektrometr LTQ XL s lineární iontovou pastí (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) pracoval při tlaku nosného plynu (N₂) 50 psi, teplotě ESI iontového zdroje 325 °C, napětí na ESI kapiláře 5 kV, napětí na vstupní kapiláře –20 V, napětí extrakční čočky –66 V, a kolizní energii 35 arbitrárních jednotek. Data byla sbírána v rozmezí hmot m/z 100 až 1500. Sběr dat byl řízen systémem Xcalibur® Data System (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

Identifikace fenolických látek byla provedena srovnáním retenčních časů, UV–VIS spekter a hmotnostních spekter s dostupnými údaji pro standardy, jejichž strukturu uvádí obrázek 6.



Obrázek 6: Standardy pro LC-MS analýzu

Kalibrační křivky těchto standardů sloužily ke kvantifikaci látek a jsou uvedeny v tabulce 8. U ostatních sloučenin byla navržena identifikace na základě srovnání naměřených dat s literaturou a kvantifikace byla provedena pomocí nejpříbuznější struktury dostupného standardu. Výsledky byly vyjádřeny v miligramech identifikované látky na gram suchého lyofilizovaného extraktu (mg/g DE).

Tabulka 8 Kalibrační údaje standardů pro LC-MS analýzu

Standard	Rovnice kalibrační křivky	R ²	Rozsah (µg/ml)
Kyselina kávová	$y=359x+488,4$	0,997	5,0-80,0
Kyselina chlorogenová	$y=304,25x-248,06$	0,998	2,5-80,0
Kyselina protokatechová	$y=258,17x+328,45$	0,996	1,0-20,0
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukosid	$y=336,36x+358,06$	0,998	2,5-80,0
Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinosid	$y=280,87x+373,73$	0,997	2,5-80,0
Kaempferol-3- <i>O</i> -glukosid	$y=236,33x+70,006$	0,999	1,87-60,0
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosid	$y=182,94x+96,644$	0,999	2,5-80,0
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glukosid	$y=218,26x-0,98$	0,992	1,87-60,0
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinosid	$y=284,12x+67,055$	0,999	1,87-60,0

4.5 Statistická analýz dat

Všechny vzorky a koncentrace byly připraveny ve třech opakováních (duplicitně v testech cytotoxicity) a všechna měření byla taktéž provedena třikrát. Výsledky jsou uváděny jako střední hodnota a směrodatná odchylka. Data byla analyzována pomocí Deanova-Dixonova testu k vyloučení odlehlých hodnot tak, že byla vypočtena kritéria Q_{\min} a Q_{\max} pro minimální a maximální hodnotu v souboru a výsledná hodnota porovnána s kritickou hodnotou kritéria Q_k , za podmínky $\{ Q_{\min}; Q_{\max} \} > Q_k$, byla daná krajní hodnota vyloučena na hladině významnosti 0,05 ($\alpha = 0,05$). K posouzení signifikantního rozdílu mezi vzorky jak v jednotlivých testech, tak v kvantitativním stanovení obsahu fenolických látek bylo provedeno vyhodnocení pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) a následně Tukeyovým HSD testem (Honestly Significant Difference) s hladinou významnosti $\alpha=0,05$.

Jmenované statistické metody byly provedeny s použitím softwaru Statistics Package for Social Sciences (SPSS) v 23.0 (IBM, Rochester, MN, USA), programu GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) a Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmont, USA).

5. VÝSLEDKY

V této kapitole jsou shrnuty výsledky extrakce, biologické aktivity a kvalitativní a kvantitativní analýzy metodou LC-MS rostliny *Momordica charantia* L. (MCH). Výsledky jsou děleny do podkapitol dle dílčího úkolu chronologicky.

Momordica charantia L.

Nadzemní
část



sušení ↓ max 40°C



extrakce ↓ 80:20 (v/v) ethanol:voda

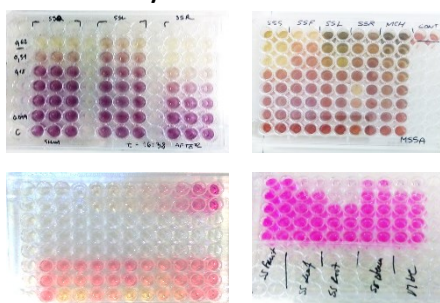
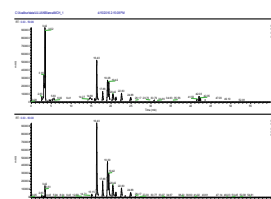
Lyofilizovaný suchý extrakt



Testy biologické
aktivity

Antimikrobiální
Antioxidační
Protizánětlivá
Antikarcinogenní
Cytotoxicita

LC-MS analýza



5.1 Extrakce MCH

V tabulce 9 je uvedena výtěžnost extrakce vzorku nadzemní části rostliny *M. charantia* (navážka 5,00 g) v 80% ethanolu po lyofilizaci. Tato hodnota byvá obvykle využita pro výpočet biologických testů a převod na jednotky objevující se v literatuře pro jejich snadnější porovnání. Výtěžnost se shoduje s jinými publikacemi, např. Lestari a kol. [107] uvádějí pro extrakci listů *M. charantia* vícekrokovou macerací 24,59 %. Kombinace ethanolu a vody v solventním systému maximalizuje v extraktu zisk polárních aktivních látek s biologickou aktivitou a zároveň má nízkou toxicitu na rozdíl od účinnějších univerzálně používaných rozpouštědel (ethylacetát, aceton, methanol) [65]. Také jiná studie uvádí, že kombinace polárních rozpouštědel se odráží v lepší antioxidační aktivitě extraktu [108].

Tabulka 9 Výtěžnost extraktu *Momordica charantia* po lyofilizaci

Vzorek	Výtěžnost (g)	Výtěžnost (%)
<i>M. charantia</i> nadzemní část	1,27±0,06	25,39±0,05

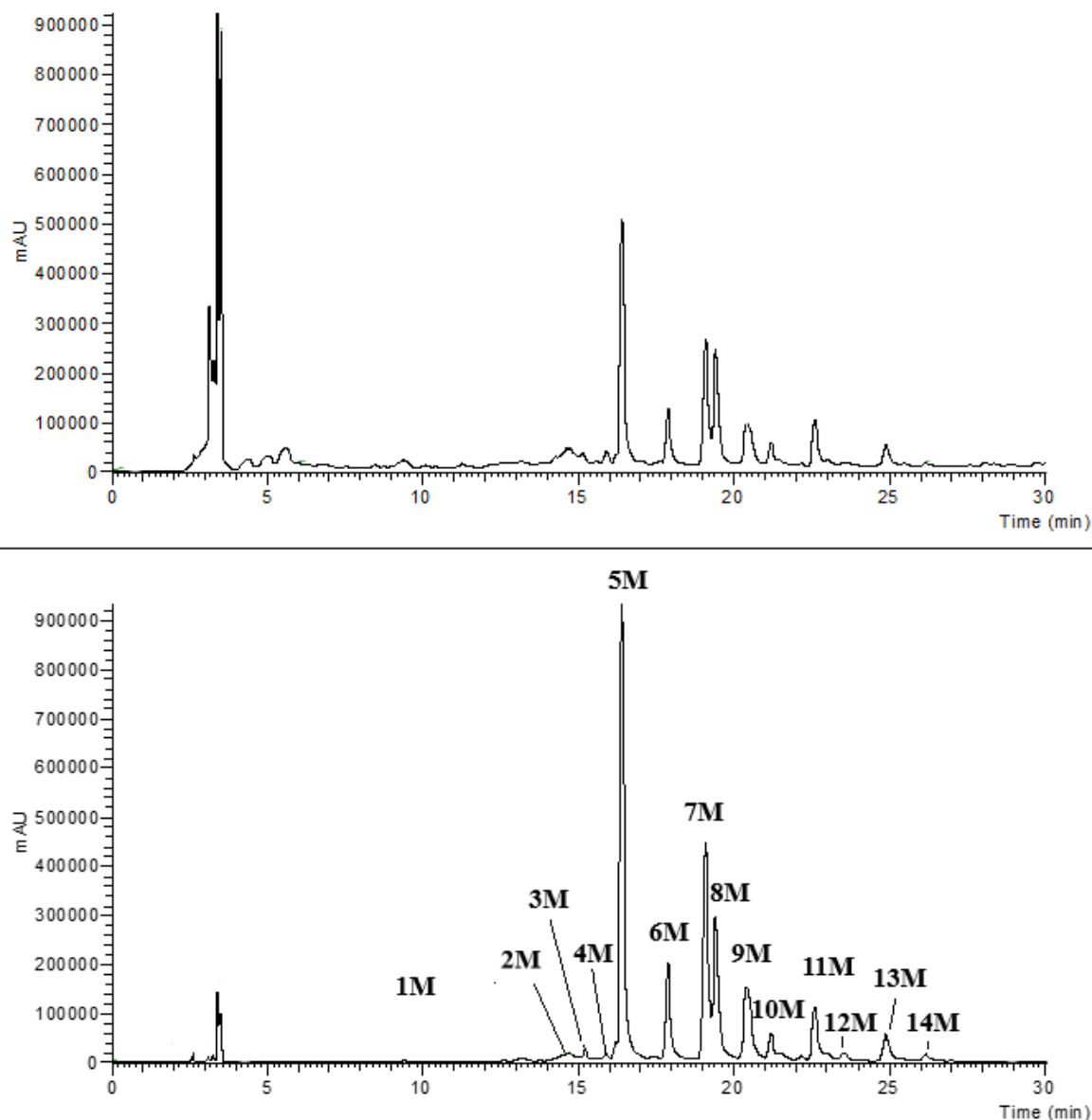
Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměr ± směrodatná odchylka (n = 3).

5.2 LC-MS analýza MCH

Ke kvalitativní a kvantitativní analýze byla použita metoda kapalinové chromatografie na reverzní fázi s DAD detekcí v UV-VIS spektru v kombinaci s hmotnostní spektrometrií využívající lineární iontovou past (UPLC-DAD-MSⁿ). Profil fenolických látek hrubého extraktu rostliny *Momordica charantia* L. (80% ethanol) byl zaznamenán při 280 a 370 nm.

Ve vzorku bylo identifikováno celkem 14 sloučenin (viz obrázek 7). Pro kvantifikaci byl vybrán chromatogram pořízený při 370 nm. Z těchto sloučenin byly tři deriváty fenolických kyselin, konkrétně hydroxyškořicové kyseliny, a jedenáct flavonoidů (flavonolové glykosidy).

Identifikace a kvantitativní stanovení jednotlivých sloučenin jsou uvedeny v tabulce 10, která uvádí retenční časy, vlnová maxima absorpčního spektra a základní identifikátory z MS spektra (deproteinovaná molekula a fragmenty z MS² spektra).



Obrázek 7: Stanovení fenolických látek v extraktu *Momordica charantia* L. (280 nm horní chromatogram a 370 nm dolní chromatogram).

Sloučenina **1M** byla identifikována jako blíže neznámý derivát kryptochlorogenové kyseliny, a to na základě výskytu deproteinované molekuly $[M-H]^-$ při m/z 435, který poskytuje ion m/z 353 a typickou fragmentaci se základním píkem při m/z 173 $[\text{chinová-H}_2\text{O}-H]^-$ kyselina, jak ji detailně popsal Clifford a kol. [109, 110]. Sloučeniny **2M** a **4M** poskytly taktéž typická fragmentační spektra pro 4-*O*- a 5-*O*-feruloylchinovou kyselinu. Na rozdíl od 3-*O*-feruloylchinové kyseliny neposkytují isomery 4-*O*- a 5-*O*-feruloylchinové kyseliny ve spektru negativní ion 193, což je opět detailně popsáno stejnými autory [109, 110].

Tabulka 10 Kvalitativní a kvantitativní stanovení fenolických látek v extraktu *Momordica charantia* metodou LC-MS/MS

Pík	R _t (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Identifikace	Kvantifikace (mg/g)
1M	9,4	330	456	353(75),191(75), 179(25),173(100), 161(3),135(5)	Derivát kryptochlorogenové kyseliny	0,83±0,06
2M	14,7	332	367	193(34),191(46), 173(100),155(20), 134(33)	4- <i>O</i> -feruloylchinová kyselina	0,48±0,03
3M	15,2	344	625	301(100) 193(46),191(100),	Kvercetin- <i>O</i> -dihexosid	0,057±0,002
4M	16,0	330	367	173(18),155(28), 134(22)	5- <i>O</i> -feruloylchinová kyselina	0,74±0,04
5M	16,4	355	595	301(100)	Kvercetin- <i>O</i> -pentosylhexosid	7,78±0,01
6M	17,9	353	609	301(100)	Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinosid	1,59±0,01
7M	19,1	354	463	301(100)	Kvercetin-3- <i>O</i> -glukosid	3,5±0,1
8M	19,4	348	579	285(100)	Kaempferol- <i>O</i> -pentosylhexosid	4,3±0,1
9M	20,4	354	505	463(30),301(80)	Kvercetin- <i>O</i> -acetylhexosid	1,69±0,03
10M	21,2	346	593	285(100)	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosid	0,795±0,004
11M	22,7	347	447	285(100)	Kaempferol-3- <i>O</i> -glukosid	1,66±0,01
12M	23,5	356	477	315(100)	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glukosid	0,291±0,003
13M	24,9	347	489	285(83)	Kaempferol- <i>O</i> -acetylhexosid	0,91±0,01
14M	26,2	358	519	315(100)	Isorhamnetin- <i>O</i> -acetylhexosid	0,26±0,02
Celkový obsah fenolických kyselin						2,05±0,01
Celkový obsah flavonoidů						22,82±0,01
Celkový obsah fenolických látek						24,87±0,01

Madala a kol. [111] uvádí přítomnost chlorogenové kyseliny v listech *M. charantia* z Jižní Afriky, přičemž jedna z nejvíce zastoupených látek identifikovaných v hydromethanolickém extraktu byla *cis*-kryptochlorogenová kyselina. Navíc autoři potvrdili také přítomnost naposled zmiňované 4-*O*-feruloylchinové kyseliny.

Mezi identifikovanými flavonoly byly deriváty kvercetinu (λ_{max} okolo 354 nm a MS² fragment *m/z* 301), kaempferolu (λ_{max} kolem 348 nm, MS² fragment *m/z* 285) a isorhamnetinu (λ_{max} kolem 356 nm, MS² fragment *m/z* 317).

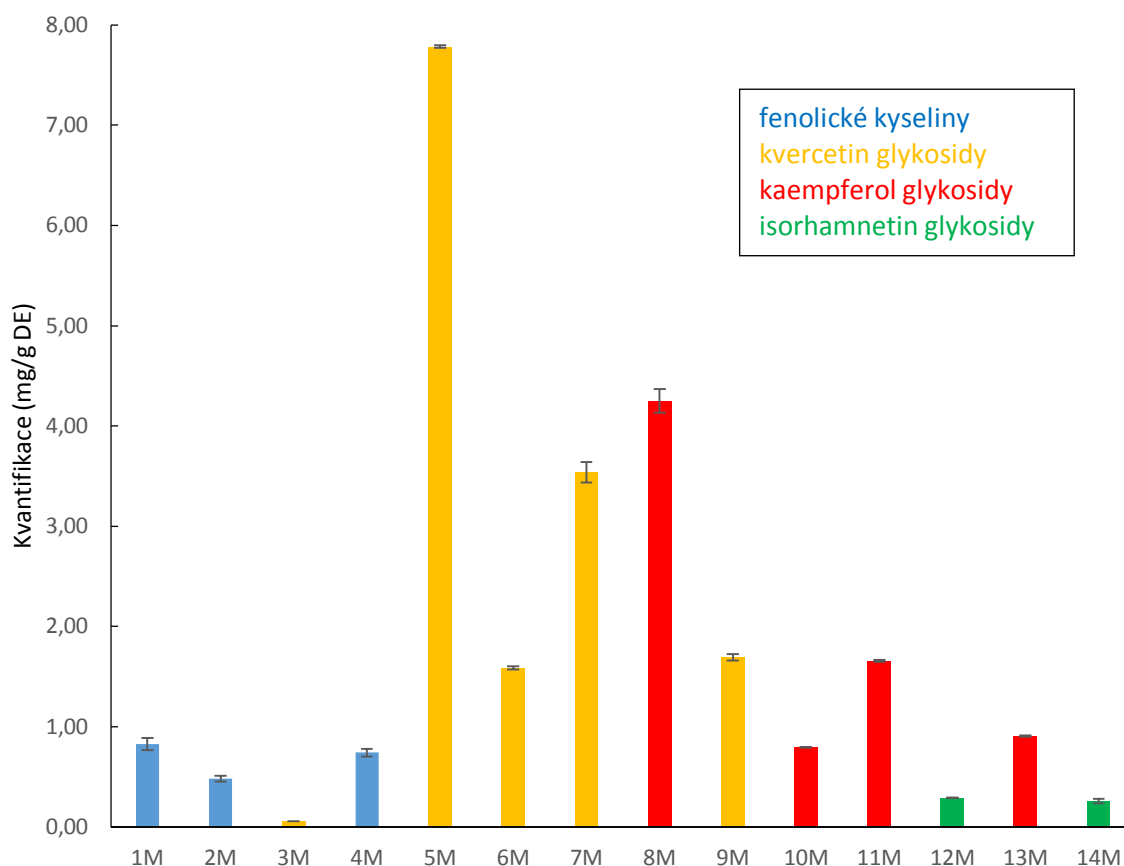
Kvercetin-3-*O*-rutinosid (rutin, pík **6M**), kvercetin-3-*O*-glukosid (isokvercitrin, pík **7M**), kaempferol-3-*O*-rutinosid (nikotiflorin, pík **10M**), kaempferol-3-*O*-glukosid (astragalin, pík **11M**) a isorhamnetin-3-*O*-rutinosid (pík **12M**) byly určeny na základě retenčních časů, hmotnostních spekter a UV-VIS charakteristik shodných s komerčně dostupnými standardy.

Sloučeniny poskytující pík **3M** ($[M-H]^-$ m/z 625) a pík **5M** ($[M-H]^-$ m/z 595) odpovídají derivátům kvercetinu, poskytují MS^2 fragment m/z 301 společně se ztrátou dvou hexos $[M-H-162-162]^-$ a pentózy s hexosou $[M-H-132-162]^-$, což vedlo k určení sloučenin kvercetin-*O*-dihexosid a kvercetin-*O*-pentosylhexosid.

Pík **8M** byl identifikován jako kaempferol-*O*-pentosylhexosid stejným postupem. U sloučeniny poskytující pík **9M** byl pozorován deproteinovaná molekula $[M-H]^-$ při m/z 505 a charakteristický MS^2 fragmentový ion s hodnotou m/z 301 odpovídající kvercetinu po ztrátě acetylhexosidu ($[M-H-42-162]^-$). Pík byl tedy přiřazen kvercetin-*O*-acetylhexosidu. Podobné fragmenty ve spektrech se objevily u píků **13M** a **14M**, ovšem s jinými aglykony, konkrétně kaempferol-*O*-acetylhexosid a isorhamnetin-*O*-acetylhexosid.

Sloučeniny **3M**, **5M**, **6M**, **10M**, **11M**, **12M** byly již dříve nalezeny v listech *M. charantia* a sloučenina **13M** byla identifikována v listech *Momordica foetida* Schumach. [112]. Z určených flavonoidů byla v literatuře popsána přítomnost rutinu (sloučenina **6M**) v čerstvých listech *M. charantia* [113] a v plodech [114]. Lako a kol. (2007) potvrdil přítomnost aglykonu isorhamnetinu v plodu *M. charantia*.

Zástupci flavanolů - katechin, epikatechin a epigallokatechin byly nalezeny v listech *M. charantia* jinými autory přesto, že ve zkoumaných vzorcích v této studii detekovány nebyly [16, 114, 116]. Hydromethanolicke extrakty z listů a stonků *M. charantia* pocházející z korejských farem ukázaly vysoký obsah kyseliny *p*-hydroxybenzoové, vanillové a kvercetinu, a dále nízký obsah kyseliny kávové, ferulové, *p*-kumarové a kaempferolu. Na druhou stranu nebyly v žádné části rostliny detekovány rutin a chlorogenová kyselina [116]. Tato variabilita může být zapříčiněna různým původem vzorků *M. charantia* a použitou extrakční metodou nebo citlivostí přístroje.



Obrázek 8: Kvantitativní zastoupení polyfenolů v extraktu *Momordica charantia*

Obrázek 8 graficky shrnuje podíl identifikovaných látek z pohledu zastoupení obou skupin polyfenolů vztažený na hmotnost suchého extraktu. Celkový obsah identifikovaných fenolických látek byl $24,87 \pm 0,01$ mg/g DE, z čehož $2,05 \pm 0,01$ mg/g DE tvořily fenolické kyseliny. Flavonoidy byly početnější skupinou fenolických látek ($22,82 \pm 0,01$ mg/g DE), přičemž kvercetin-*O*-pentosylhexosid (sloučenina **5M**) byl shledán kvantitativně nejvíce zastoupenou molekulou s $7,78 \pm 0,01$ mg/g DE. S tímto aglykonem byly i další tři látky ve vyšším množství (**6M**, **7M** a **9M**).

Množství glykosidů kaempferolu bylo poněkud nižší, s kaempferol-*O*-pentosylhexosidem (**8M**) jako nejvíce zastoupenou sloučeninou ($4,3 \pm 0,1$ mg/g DE). Glykosidy isorhamnetinu byly nalezeny v podstatně menším množství. Z flavonoidů identifikovaných díky dostupnému standardu obsahujících aglykon kvercetinu byl ve větším množství nalezen isokvercitrin (**7M**) s $3,5 \pm 0,1$ mg/g DE a rutin (**6M**) v koncentraci $1,59 \pm 0,01$ mg/g DE. Flavonoidy s kaempferolem pak v nižším množství byly zastoupeny astragalinem (**11M**) s $1,66 \pm 0,01$ mg/g DE a nikotiflorinem (**10M**) s $0,795 \pm 0,004$ mg/g DE.

Kvantitativní stanovení jednotlivých flavonoidních glykosidů (kromě rutinu) doposud nebylo u divoce rostoucí variety rostliny *Momordica charantia* L popsáno. Madala a kol. zmiňuje flavonoidní glykosidy u užitkově pěstované variety *M. charantia*, a to pouze kvalitativně [111, 112]. Konkrétně sloučeniny **4M**, **7M**, **8M**, **9M**, **13M** a **14M** byly u planého druhu *Momordica charantia* identifikovány poprvé.

5.3 Biologická aktivita MCH

Rostoucí počet bakteriálních kmenů rezistentních vůči dostupným antibiotikům je novou hnací silou k získání nových sloučenin s antimikrobiální aktivitou [117]. Také v potravinářském průmyslu vzrostla poptávka po přírodních látkách s antimikrobiálním účinkem, které by byly účinné vůči potraviny kontaminujícím patogenům a zároveň pro spotřebitele bezpečné. Již několik látek přírodního původu, které nevykazují toxicitu a jsou tedy pro člověka bezpečné, našlo své uplatnění v potravinářském průmyslu, např. kyselina rozmarýnová, thymol, chotisan, karvakrol či nisin [1]. To dokazuje, že příroda má stále co nabídnout a je možné rozšířit poptávku po těchto látkách, které by nahradily synteticky připravované sloučeniny.

U rostliny *M. charantia* byla testována sada biologických aktivit na extraktu (v 80% ethanolu) z celé nadzemní části. Jednotlivé aktivity jsou rozděleny do vlastních sekcí.

5.3.1 Antimikrobiální aktivita MCH

Ve spolupráci s Polytechnickým institutem v Bragance (Portugalsko) byly provedeny testy antimikrobiální aktivity vůči sérii klinických izolátů reprezentující bakterie, které způsobují vážné mikrobiální infekce, a proto by mohly pomoci ve vývoji nutraceutik a jiných potravinářských produktů s preventivním působením vůči těmto nemocem. Jak je známo, rostlinné extrakty, na rozdíl od řady antibiotik, mívají jen sporadicky vedlejší účinky a jsou v zásadě bezpečné pro konzumenta i při dlouhodobějším příjmu ve stravě či dietě [1]. Osm kmenů zastupující grampozitivní i gramnegativní bakterie bylo testováno bujónovou mikrodiluční metodou s kolorimetrickým vyhodnocením pomocí *p*-jodnitrotetrazoliové violeti (INT test).

Nejprve byly vyhotoveny testy rezistence kmenů vůči panelu antibiotik. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 11 a 12 na následujících stránkách.

Tabulka 11 Test rezistence gram pozitivních bakterií vůči antibiotikům; MIC ($\mu\text{g/ml}$).

Antibiotikum	MRSA		MSSA		<i>E. faecalis</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
Penicilin	>8	R	≤ 0.12	S	na		na	
Ampicilin	na		na		≤ 4	S	≤ 0.25	S
Oxacilin	>0.25	R	≤ 0.25	S	na		na	
Klindamycin	na		>0.5	R	na		na	
Erytromycin	na		>2	R	na		na	
Ceftarolin	≤ 1	S	na		na		na	
Gentamicin	na		≤ 1	S	na		na	
Ciprofloxacin	na		>1	R	na		na	
Levofloxacin	na		>2	R	na		na	
Nitrofurantoin	na		na		≤ 64	S	na	
Linezolid	≤ 4	S	na		na		na	
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	na		$\leq 2/38$	S	na		$\leq 2/38$	S
Vancomycin	≤ 2	S	≤ 2	S	≤ 2	S	na	

MSSA - methicilin-senzitivní *Staphylococcus aureus*; MRSA - methicilin-resistentní *Staphylococcus aureus*; S - citlivý; I – středně citlivý; R - resistentní: klasifikace na základě interpretačních breakpointů navržených dle Klinických breakpointů vydaných Ústavem pro klinickou a laboratorní standardizaci (CLSI, 2008) a Evropskou komisí pro testování antimikrobiální citlivosti (EUCAST, 2013); na – nehodnoceno

Testy proběhly v koncentračním rozmezí 0,12 – 320 $\mu\text{g/ml}$. *S. aureus* MRSA byl z testovaných antibiotik resistentní vůči penicilinu a oxacilinu, což se očekávalo, napak senzitivní vůči ceftarolinu, linezolidu a vankomycinu. Naproti tomu MSSA byl dle očekávání citlivý na přítomnost penicilinových antibiotik (penicilin, oxacilin) a dále gentamicinu, trimethoprimu a sulfamethoxazolu, stejně jako vankomycinu. Rezistenci vykázal vůči klindamycinu a erytromycinu a dále vůči ciprofloxacinu a levofloxacinu. *E. faecalis* byl senzitivní vůči třem typům antibiotik, jmenovitě ampicilinu, nitrofurantoinu a vankomycinu. *L. monocytogenes* byl citlivý na ampicilin a trimethoprimu a sulfamethoxazol.

Tabulka 12 Test rezistence gramnegativních bakterií vůči antibiotikům; MIC ($\mu\text{g/ml}$).

Antibiotikum	<i>A. baumannii</i>		<i>E. coli</i>		<i>E. coli</i> ESBL		<i>K. pneumoniae</i>		<i>K. pneumoniae</i> ESBL		<i>P. aeruginosa</i>	
Ampicilin	na		>8	R	na		>8	R	≥ 32	R	na	
Amoxicilin/ Kys. klavulanová	na		$\leq 8/4$	S	na		$\leq 8/4$	S	≥ 32	R	na	
Amikacin	na		na		16	I	na		≤ 2	S	≤ 8	S
Cefuroxim	na		≤ 4	S	na		>8	R	≥ 64	R	na	
Cefotaxim	>32	R	≤ 1	S	na		>2	R	≥ 64	R	na	
Ceftazidim	16	I	≤ 1	S	≥ 64	R	na		16	R	>8	R
Norfloxacin	na		>8	R	na		>1	R	na		na	
Levofloxacin	na		na		na		na		≥ 8	R	>2	R
Ciprofloxacin	>2	R	>1	R	0.5	S	>1	R	≥ 4	R	>1	R
Nitrofurantoin	na		≤ 32	S	na		>64	R	256	R	na	
Fosfomycin	na		≤ 16	S	na		≤ 32	S	na		na	
Colistin	na		na		≤ 0.5	S	na		na		≤ 4	S
Gentamicin	4	R	>4	R	≤ 1	S	≤ 2	S	≥ 16	R	> 4	R
Imipenem	na		na		0.5	S	na		na		>8	R
Meropenem	na		na		≤ 0.25	S	na		≤ 0.25		>8	R
Piperacilin/ Tazobactam	na		na		≤ 4	I	≤ 8	S	≥ 128	R	>16	R
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	na		>4/76	R	≤ 20	S	>4/76	R	≥ 320	R	na	
Tobramycin	≤ 2	S	na		≥ 16	R	na		≥ 16	R	> 4	R

MIC – minimální inhibiční koncentrace; S - citlivý; I – středně citlivý; R - rezistentní; klasifikace na základě interpretačních breakpointů navržených dle Klinických breakpointů vydaných Ústavem pro klinickou a laboratorní standardizaci (CLSI, 2008) a Evropskou komisí pro testování antimikrobiální citlivosti.(EUCAST, 2013); na - nehodnoceno

Klinický izolát kmene *A. baumannii* byl rezistentní vůči třem antibiotikům, středně citlivý na ceftazidim a citlivý na tobramycin. *E. coli* byla senzitivní vůči

4 a rezistentní vůči 6 druhům antibiotik a ESBL kmen *E. coli* byl taktéž sensitivní k 6 antibiotikům, ale rezistenci ukázal pouze u 2 antibiotik, u dalších dvou byl středně citlivý. *K. pneumoniae* a její ESBL kmen byly ze všech mikroorganismů nejvíce rezistentní (7 a 12 antibiotik, resp.), citlivé pak byly na 4 druhy a ESBL dokonce pouze na jediné léčivo, konkrétně amikacin. *P. aeruginosa* ukázala rezistenci na 8 antibiotik a senzitivitu na dvě, amikacin a colistin. Velmi častým antibiotikem používaným jako pozitivní kontrola v testech antimikrobiální aktivity je ciprofloxacin. V tomto testu bylo ovšem 6 z 9 testovaných mikroorganismů vůči němu rezistentní. Jako kontrolní antibiotikum u klinických isolátů tudíž není možno vybrat jediný preparát, ale je nutno dokládat tyto referenční tabulky sensitivity.

V tabulce 13 jsou shrnuty minimální inhibiční koncentrace (MIC) extraktů vůči jednotlivým bakteriálním kmenům. Jak je patrné, u všech kmenů byla zachycena hodnota MIC, která se pohybovala mezi 0,625 a 10 mg/ml. Celkově byly grampozitivní kmeny citlivější, což je dáno nižšími hodnotami získaných MIC 0,625 až 5 mg/ml, zatímco u gramnegativních kmenů mezi 5 až 10 mg/ml. Tato skutečnost je velmi často přisuzována rozdílné struktuře buněčných obalů a horší prostupnosti účinných látek přes komplexnější stěnu gramnegativních bakterií s lipopolysacharidovou vrstvou [118].

Tabulka 13 Antibakteriální aktivita extraktu (80% ethanol) z planě rostoucí rostliny *Momordica charantia* proti vybraným klinickým izolátům bakterií

Mikroorganismus	MIC (mg/ml)	Mikroorganismus	MIC (mg/ml)
Grampozitivní kmeny		Gramnegativní kmeny	
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,25	<i>Acinetobacter baumannii</i>	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,625	<i>Escherichia coli</i>	5
MSSA	5	<i>Escherichia coli</i> ESBL	5
MRSA	5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	5
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10

MRSA = methicilin-resistentní *Staphylococcus aureus*; MSSA = methicilin-senzitivní *Staphylococcus aureus*; ESBL = producenti širokospektrých β -laktamáz; MIC = minimální inhibiční koncentrace

Listeria monocytogenes reagovala nejcitlivěji vůči extraktu MCH (MIC = 0,625 mg/ml), zatímco u *A. baumannii* a *P. aeruginosa* byly naměřeny nejvyšší hodnoty MIC, v obou případech 10 mg/ml. Z výsledků lze konstatovat, že extrakt vykazuje širokospektrální účinek, ačkoli hodnota MIC ve srovnání se standardem je daleko vyšší, což lze u extraktu očekávat vzhledem ke komplexnosti matrice ve srovnání s čistou látkou.

Antibakteriální aktivita rostliny MCH byla potvrzena několika studiemi zmiňující účinek proti *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* a *K. pneumoniae* [23, 119, 120]. Podobně jako v této práci, inhiboval ethanolicý extrakt z listů MCH klinické izoláty bakterií *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Shigella dysenteriae* a *Salmonella typhi* při koncentraci 20 mg/ml [121]. V jiné studii diskovou difúzní metodou s klinickými izoláty *P. aeruginosa*, *E. coli* a *K. pneumoniae* naproti tomu nebyla detekována aktivita u methanolicého extraktu z listů MCH, zatímco extrakt z plodu inhiboval tyto kmeny při koncentraci 1000 mg/ml. [122].

Extrakt připravený z nadzemní části (natě) MCH v 75% methanolu byl účinný vůči bakteriím *L. monocytogenes*, *S. aureus* a *P. aeruginosa*, jak uvádí Rakholiya a kol. [123]. Daleko slibnější hodnoty byly zjištěny u extraktu z listů MCH pocházející z ostrova Mauritius.

V případě *E. coli* byla zjištěna MIC = 1 mg/ml a u *P. aeruginosa* MIC = 7 mg/ml, zatímco ani MSSA ani MRSA nebyly v testu inhibovány [124]. Ve srovnání s výsledky v této práci popsali Costa a kol. (2010) mnohem nižší hodnoty pro MSSA, MRSA, *E. coli* a resistantní kmen *E. coli* (MIC = 256, 256, 27 a 32 µg/ml). I v jejich případě byla pozorována stejná hodnota MIC pro MSSA a MRSA, což naznačuje u MCH přítomnost antimikrobiálních látek se specifickým mechanismem účinku, který je schopen zacílit i resistantní kmeny *S. aureus*. V další studii byl extract MCH ze stonku a listů schopen velmi silně inhibovat *A. baumannii* (MIC = 250 µg/mL) [126].

Publikace zaměřené specificky na plané variety MCH se v závěrech značně liší. Zatímco Lu a kol. [127] nepozorovali žádnou antimikrobiální aktivitu extraktu z plodu zbavených semen vůči *S. aureus*, *E. coli* a *P. aeruginosa* ani při koncentraci 10 mg/ml, Jagessar a kol. [128] získal široké inhibiční zóny v diskové difúzní metodě pro *E. coli* a *S aureus* (22 mm; 18 mm) při koncentraci 3 mg/ml ethanolicého extraktu MCH. Samozřejmě při srovnávání je nutno zohlednit rozdílné metody a původ bakteriálních kmenů, zejména jde-li

o klinické izoláty a sbírkové kmeny, stejně jako původ a zpracování rostlinného materiálu. Na závěr je nutno podotknout, že většina autorů zmiňuje vyšší aktivitu u rozpouštědel méně polárních ve srovnání s vodou (MeOH, EtOH, EtOAc).

Antimikrobiální aktivita flavonoidů je dobře známa a byla popsána i u sloučenin detekovaných v této práci, například kvercetin, rutin, kaempferol, kvercitrin a další [129]. Ve studovaném vzorku byly nalezeny právě deriváty kaempferolu a kvercetinu (včetně velmi známé sloučeniny rutinu), a proto je možno přisuzovat antimikrobiální aktivitu těmto látkám, které se zde vyskytují ve velkém množství.

5.3.2 Antioxidační aktivita MCH

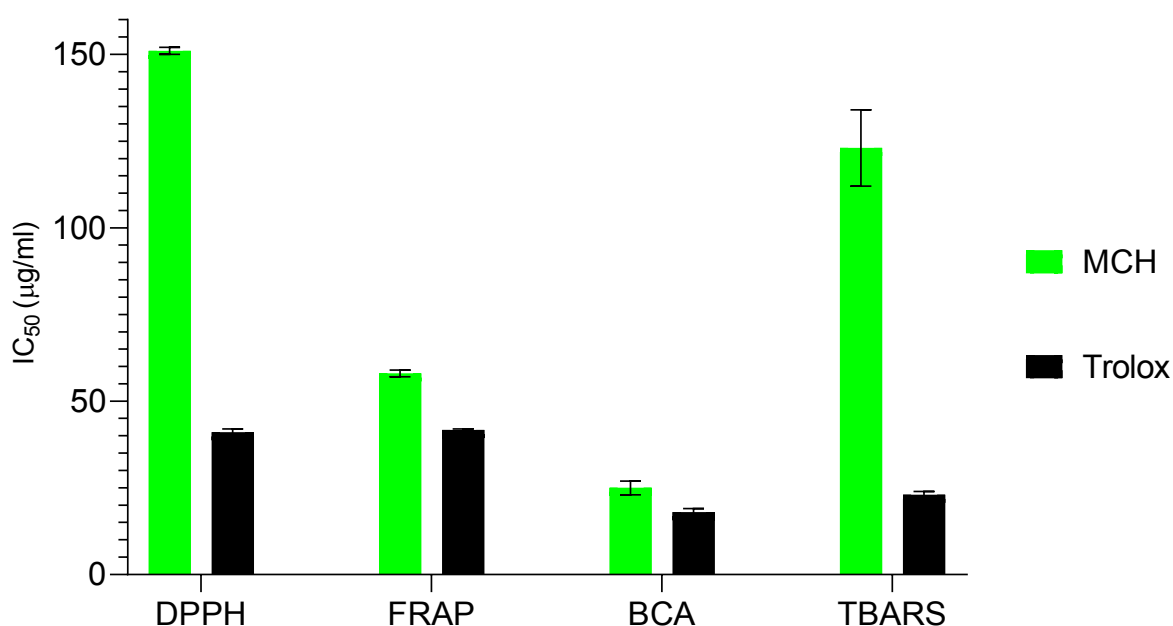
K posouzení antioxidační aktivity extraktu *M. charantia* byly vybrány čtyři *in vitro* testy pokrývající několik mechanismů prevence proti oxidačnímu poškození. Jednalo se o testovací metody DPPH, FRAP, BCA a TBARS, jejichž detailní popis je obsažen v předchozích kapitolách. DPPH je rychlá metoda zjišťující přítomnost molekul, které jsou schopny poskytovat vodíkový ion či elektron k vychytávání volných radikálů. FRAP využívá železitých iontů jako oxidačních činitelů a detekce železnatých iontů tvořených díky antioxidantům, které pomocí přenosu singletového elektronu redukují Fe^{3+} ionty. V testu BCE se hodnotí schopnost antioxidantů pomocí HAT mechanismu zabránit radikálu linoleové kyseliny napadnout dvojné vazby molekuly β -karotenu. TBARS metoda využívá biomarkery lipidové peroxidace thiobarbiturovou kyselinu (TBA) a malonylaldehyd (MDA) k určení schopnosti antioxidantu předejít tvorbě chromogenu TBA-MDA [4].

Tabulka 14 Biologická aktivita ethanolického extraktu (80%) z planě rostoucí rostliny *Momordica charantia* (MCH)

<i>Antioxidační aktivita (IC₅₀ = µg/ml)</i>		
	MCH	Trolox
DPPH	151±1 ^a	41±1 ^b
FRAP	58±1 ^a	42±0 ^b
BCA	25±2 ^a	18±1 ^b
TBARS	123±11 ^a	23±1 ^b

^a Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměr ± směrodatná odchylka (n = 9); hodnoty s různým indexem ve stejném řádku jsou statisticky odlišné na hladině významnosti $p < 0,05$.

Výsledky všech metod určení antioxidační aktivity jsou uvedeny v tabulce 14. U extraktu (80% ethanol) z nadzemní části rostliny *M. charantia* byla zaznamenána signifikantní antioxidační aktivita ve všech čtyřech metodách s efektivní inhibiční koncentrací IC_{50} v rozmezí 25 ± 2 až 151 ± 1 $\mu\text{g/ml}$. U metod BCA a FRAP byly výsledky extraktu MCH (25 ± 2 a 58 ± 1 $\mu\text{g/ml}$) velmi slibné ve srovnání s komerčně dostupným standardem Troloxu, hydrofilním analogem vitamínu E, u něhož byly získány hodnoty 18 ± 1 a 42 ± 0 $\mu\text{g/ml}$ (obrázek 9).



Obrázek 9: Antioxidační aktivita extraktu *Momordica charantia*. Použitý standard: Trolox

Lze říci, že vzhledem k prokázané redukční schopnosti obsahuje extrakt MCH sloučeniny se schopností udržet redox potenciál buněk. Již dříve byl dokázán vztah mezi redukční schopností a stupněm hydroxylace a konjugace fenolických sloučenin [130]. Zmínění autoři popisují vyšší antioxidační potenciál kvercetin a rutin ve FRAP testu ve srovnání s Troloxem. Isokvercitrin (sloučenina **7M**), rutin (sloučenina **6M**) a glykosidy kvercetin, přítomné v extraktu MCH, mohou být proto zodpovědné za silný antioxidační účinek, jelikož již v předchozích studiích ukázaly srovnatelné nebo vyšší antioxidační schopnosti než například BHT (butylhydroxytoluen) či α -tokoferol [131]. Také třetí kvantitativně nejvíce zastoupená sloučenina isokvercitrin (**7M**) spolu s nikotiflorinem (**10M**)

a astragalinem (**11M**) ukázaly silný potenciál ve vycytávání volných radikálů v dřívějších studiích [132].

M. charantia se vyskytuje jednak jako kulturní plodina pěstovaná pro plod s názvem hořká okurka, která je vyhledávanou zeleninou, a potom jako divoká, planě rostoucí varieta. Zatímco výzkum kulturní plodiny je obsáhlý [16, 21, 116], jen málo studií se věnuje její plané varietě. Wu a Ng [133] získali podobná data v DPPH testu pro ethanolický extrakt z plodů planě rostoucí MCH ($IC_{50} = 157 \mu\text{g/ml}$) překračující aktivitu pro vitamin E ($IC_{50} = 172 \mu\text{g/ml}$). Nicméně ve stejné studii byl tento extrakt v TBARS testu jen málo účinný. Lu a kol. [134] zkoumali 16 kultivarů plané *M. charantia* pocházející z Taiwanu, přičemž methanolický extrakt s nejvyšším antioxidačním výsledkem v DPPH testu poskytoval podobné hodnoty ($IC_{50} = 181 \mu\text{g/mL}$) k získaným v této studii ($IC_{50} = 151 \pm 1 \mu\text{g/ml}$), zatímco výsledky pro vodný extrakt byly horší ($IC_{50} = 246 \mu\text{g/mL}$). Označení IC a EC budiž považováno za rovnocenné na základě srovnání postupu a výpočtu.

Nagarani a kol. [135] potvrdili skutečnost, že planě se vyskytující rostliny druhu *Momordica* obsahují v extraktech efektivnější antioxidanty a protizánětlivé látky ve srovnání s kultivovanými odrůdami. Nicméně detailnější určení přítomných fenolických a dalších látek, které by stály za tímto fenoménem, stále srovnáno nebylo, zejména pokud jde o flavonoidní glykosidy. Z toho důvodu je zřejmé, že současná práce přináší hlubší pohled přispívající k získání informací o přítomných aktivních látkách u planě se vyskytující *M. charantia*.

5.3.3 Protizánětlivá aktivita MCH

Oxidační stres a z něj plynoucí poškození buněčných struktur DNA, proteinů a součástí cytoplazmatické membrány hraje zásadní roli v zánětlivých onemocněních, neurodegenerativních procesech a také vzniku rakovinného bujení [76]. Vzhledem k této souvislosti bylo vedle antioxidačního potenciálu u MCH extraktů provedeno také *in vitro* určení protizánětlivé a antikarcinogenní aktivity. Oxid dusnatý (NO) je jakožto pleiotropicky působící mediátor indukován v místě zánětlivého procesu a v testech slouží k určení míry protizánětlivé aktivity v RAW 264.7 makrofázích stimulovaných pomocí LPS [136].

Tabulka 15 Protizánětlivá aktivita ethanolického extraktu (80%) z planě rostoucí rostliny *Momordica charantia* (MCH)

Protizánětlivá aktivita ($IC_{50} = \mu\text{g/ml}$)

	MCH	Dexamethason
Produkce oxidu dusíku (NO)	146±8 ^a	16±1 ^b

^a Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměr ± směrodatná odchylka (n = 9), hodnoty s různým indexem ve stejném řádku jsou statisticky odlišné na hladině významnosti $p < 0,05$

Jak ukazuje tabulka 15, u ethanolického extraktu z plané MCH byla zjištěna inhibice produkce NO s výslednou hodnotou $IC_{50} = 146 \pm 8 \mu\text{g/ml}$. Podobný výsledek zaznamenal Hsu a kol. pro plody MCH, extrahované v ethylacetátu [137]. Autoři také popsali inhibici produkce dalších mediátorů zánětu, jmenovitě cytokinů IL-6, MCP-1, PGE2, a TNF- α .

Z listů plané MCH byly izolovány kukurbitanové triterpenoidy, jež potlačovaly hladiny mediátorů zánětu IL-6, IL-8 a IL-1 β [138]. Velmi zajímavý výsledek srovnatelný s podáním stejného množství léčivé látky indomethacinu byl pozorován u methanolického extraktu z listů MCH v *in vivo* studii otoku tlapek indukovaného karangenanem [139].

Hsu a kol. [137] dali do souvislosti přítomnost fenolických látek v extraktu z plané MCH a jejich protizánětlivého účinku, pozorovaného jakožto snížení hladiny matrixové metaloproteinázy MMP-9 v zánětu THP-1 buněčné linii monocytů, vyvolaném bakterií *Propionibacterium acnes*. Důležitost studia planých forem rostlinných druhů potvrzuje studie z roku 2009, která shledala extrakt z plodů plané variety MCH účinnějším než jeho analogický extrakt z kultivované MCH v testu na RAW 264.7 makrofázích stimulovaných pomocí LPS, kdy došlo k 64% redukci oxidu dusnatého při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ ethanolického extraktu oproti kontrole [140]. Ze studovaných extraktů připravených v různých rozpouštědlech navíc dobře koreloval obsah celkových fenolů a výsledky protizánětlivé aktivity. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo u ethanolického extraktu (vedle extrakce horkou vodou, studenou vodou nebo ethylacetátem).

Fenolické látky jsou všeobecně považovány za důležité složky rostlinných extraktů s protizánětlivým účinkem [80]. Ze sloučenin, které byly odhaleny v této práci, byly již dříve s protizánětlivým účinkem asociovány zejména rutin

[141], nikotiflorin [142], isokvercitrin [143], astragalín [144] a formy chlorogenové kyseliny [80].

5.3.4 Antikarcinogenní aktivita a cytotoxicita MCH

Tabulka 16 shrnuje data získaná v testu cytotoxicity vůči čtyřem lidským nádorovým buněčným liniím (HeLa, Hep2G, MCF-7 a NCI-H460) a nerakovinotvorné primární buněčné linii PLP2. U všech použitých vzorků (kromě PLP2) byla pozorována závislost účinku na dávce. Nejnižší hodnota IC_{50} ($112 \pm 6 \mu\text{g/ml}$) byla získána pro buněčnou linii MCF-7, tudíž je extrakt *M. charantia* nejúčinnější v případě buněk karcinomu prsu. Nejméně inhibovanou tkáňovou kulturou byla buněčná linie karcinomu plic NCI-H460, u níž bylo naměřeno IC_{50} $210 \pm 17 \mu\text{g/ml}$.

Tabulka 16 Antikarcinogenní aktivita a cytotoxicita extraktu *M. charantia*

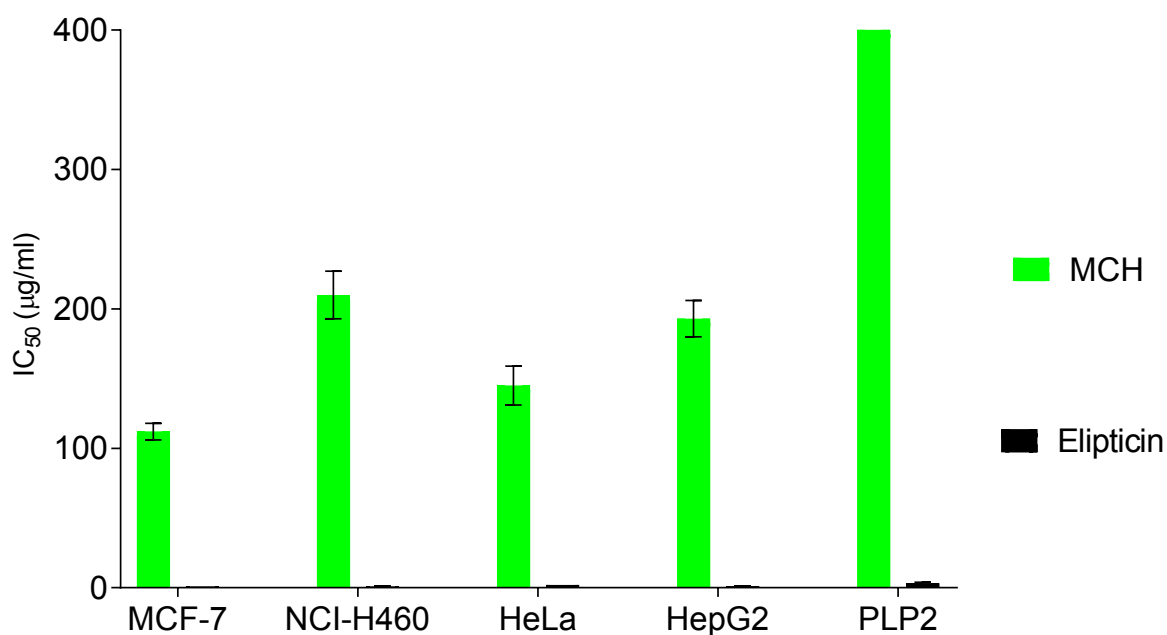
<i>Cytotoxicita u nádorových buněčných linií ($IC_{50} = \mu\text{g/ml}$)</i>		
	MCH	Elipticin
MCF-7 (karcinom prsu)	112 ± 6^a	$0,91 \pm 0,04^b$
NCI-H460 (karcinom plic)	210 ± 17^a	$1,0 \pm 0,1^b$
HeLa (karcinom děložního čípku)	145 ± 14^a	$1,91 \pm 0,06^b$
HepG2 (hepatocelulární karcinom)	193 ± 13^a	$1,1 \pm 0,2^b$
<i>Cytotoxicita u nenádorové buněčné linie ($IC_{50} = \mu\text{g/ml}$)</i>		
PLP2	>400	$3,2 \pm 0,7$

^a Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm směrodatná odchylka ($n = 9$), hodnoty s různým indexem ve stejném řádku jsou statisticky odlišné na hladině významnosti $p < 0,05$

Data graficky shrnuje obrázek 10. Ačkoli dosáhl extrakt o dva řády nižších hodnot u sledované antikarcinogenní aktivity ve srovnání se standardem elipticinem, je na rozdíl od této čisté látky, vykazující silnou toxicitu, netoxický vůči primární buněčné linii PLP2 až do měřených hodnot $400 \mu\text{g/ml}$.

Hrubý extrakt z rostliny *M. charantia* byl podroben mnoha studiím *in vitro* a *in vivo* potvrzujících antikarcinogenní aktivitu vůči nádorovým buňkám rakoviny prsu, plic, prostaty, kůže, leukémii a podobně [21]. Existuje také zmínka pro planě rostoucí MCH z Thaianu, u níž methanolický extrakt z plodů vykázal velmi silný cytotoxický účinek vůči buňkám lidského fibrosarkomu HT 1080 srovnatelnými s doxorubicinem [127].

Bai a kol. (2016) izolovali z plané MCH triterpen kukurbitanového typu, který inhiboval buněčné linie MCF-7 a MDA-MB-231. Ačkoli je antiproliferativní účinek u tohoto druhu asociován s triterpenoidy [21], je u velkého množství fenolických látek také prokázán silný protinádorový potenciál. Například isokvercitrin byl v MTT testech shledán účinnějším než rutin [146]. Kvercetin a jeho glykosidy (kupříkladu kvercetin-3-O- β -d-glucopyranosid) vykazoval silný antiproliferativní účinek proti liniím MCF-7 a HepG2 [147].



Obrázek 10: Antikarcinogenní aktivita extraktu *Momordica charantia*. U hodnot $IC_{50} > 400 \mu\text{g/ml}$ byla v grafu záměrně vyznačena maximální hodnota sloužící k porovnání míry aktivity vzorků. Použitý standard v testu: elipticin

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, protinádorová aktivita byla v mnoha studiích dána do přímé souvislosti s antioxidační aktivitou a byly popsány detailně oxidační mechanismy, které jsou zapojeny v karcinogenezi [148]. I výsledky této práce indikují možnou souvislost mezi antioxidační, protizánětlivou a cytotoxicitou vůči rakovinným buněčným liniím, jelikož extrakt *M. charantia* byl účinný ve všech těchto testech.

Solanum stramonifolium
Jacq.



sušení max 40°C



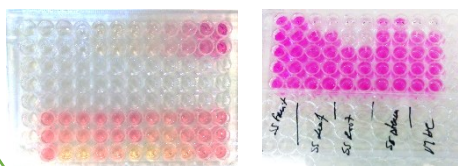
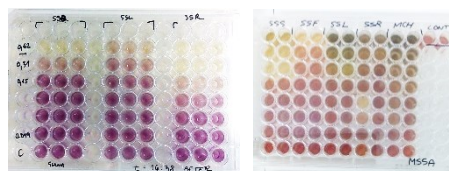
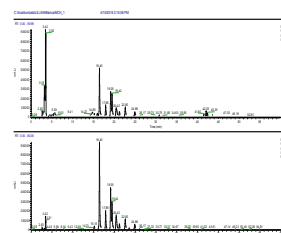
extrakce 80:20 (v/v)
ethanol:voda

Lyofilizované suché extrakty

Testy biologické
aktivity

LC-MS
analýza

Antimikrobiální
Antioxidační
Protizánětlivá
Antikarcinogenní
Cytotoxicita



V této části jsou popsány profily fenolických látek identifikované v připravených hrubých extraktech z jednotlivých částí rostliny *Solanum stramonifolium* Jacq. a následně jsou shrnuty výsledky testů biologické aktivity těchto extraktů.

5.4 Extrakce SS

V tabulce 17 je shrnuta výtěžnost jednotlivých vzorků. Vzhledem k široké variabilitě jednotek uváděných u výsledků biologických testů v literatuře jsou tyto hodnoty nutné pro pozdější přepočty a porovnání aktivity s literaturou.

Tabulka 17 Výtěžnost extraktů *S. stramonifolium* po lyofilizaci

Vzorek	Výtěžnost (g)	Výtěžnost (%)
<i>S. stramonifolium</i> plod	1,01±0,02	20,19±0,02
<i>S. stramonifolium</i> list	1,03±0,02	20,55±0,01
<i>S. stramonifolium</i> kořen	0,34±0,02	6,87±0,02
<i>S. stramonifolium</i> stonek	0,64±0,02	12,74±0,02

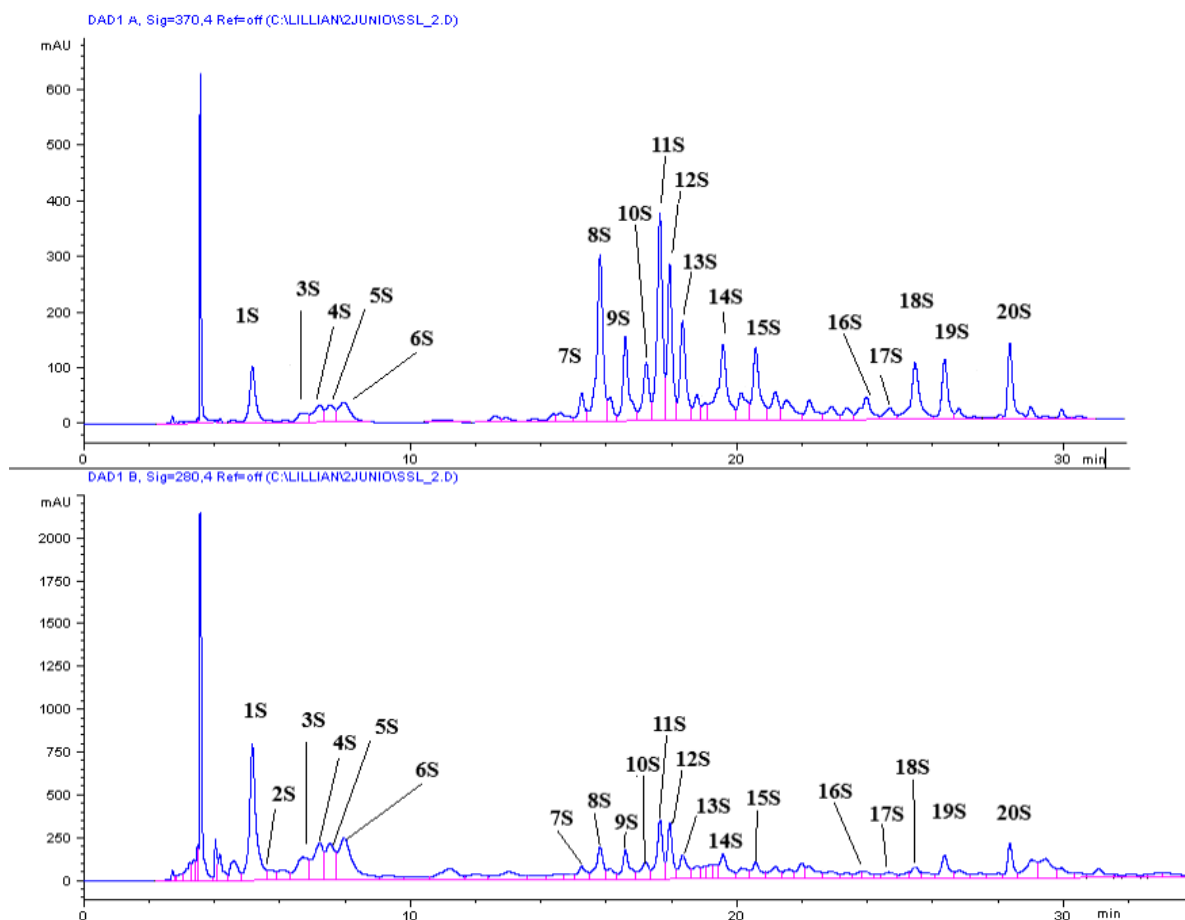
Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměr ± směrodatná odchylka (n = 3).

Nejvyššího výtěžku bylo dosaženo u extraktu z listů (20,55±0,01 %). Výtěžnost klesala v řadě list > plod > stonek > kořen. U kořene je výtěžnost obvykle menší z důvodu přítomnosti látek nerozpustných v polárních rozpouštědlech typu voda, ethanol a methanol, jak uvádí např. Sultana a kol [65].

5.5 LC-MS analýza SS

Profily fenolických látek hrubého extraktu z jednotlivých částí rostliny *Solanum stramonifolium* Jacq. (80% ethanol) byly zaznamenány při 280 a 370 nm pomocí systému UPLC–DAD–ESI/MSⁿ. V tabulkách 18 a 19 jsou shrnuta chromatografická data nalezených fenolických sloučenin přítomných v ethanolických extraktech z listů, stonků a kořenů rostliny *Solanum stramonifolium* Jacq.

Obrázek 11 zobrazuje profil fenolických látek identifikovaných v listu *S. stramonifolium*. Celkem bylo určeno 20 fenolických látek a jejich kvantifikace byla provedena ze spektra naměřeného při 370 nm.



Obrázek 11: Stanovení fenolických látek v extraktu z listu *S. Stramonifolium* (280 nm horní chromatogram a 370 nm dolní chromatogram)

V listech bylo určeno 6 derivátů fenolických kyselin a 14 flavonoidů (glykosylované deriváty flavonolů). V extraktu z plodů se nepodařilo přes veškerou snahu touto standardizovanou metodou určit obsažené látky, proto není součástí dalšího hodnocení. Negativní ionty a neutrální ztráty v MS^2 spektrech byly spolu s retenčními časy a údaji z UV spektra použity k určení molekulové hmotnosti a identifikaci sloučenin a jsou shrnuty v tabulce 18.

Sloučeniny **2S** a **6S** byly identifikovány jako protokatechová kyselina a chlorogenová kyselina (5-*O*-caffeoylchinová) na základě srovnání s LC-MS daty komerčně dostupných standardů.

Tabulka 18 Kvalitativní a kvantitativní stanovení fenolických látek v extraktu z listů rostliny *Solanum stramonifolium*

Pík	R _t (min)	λ _{max} (nm)	[M- H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Identifikace	Kvantifikace (mg/g)
1S	5,1	328	353	191(100), 179(45), 172(4), 135(56)	<i>trans</i> -neochlorogenová kyselina	6,49±0,05
2S	5,7	262, 292sh	153	119(100)	Protokatechová kyselina	0,37±0,09
3S	6,7	328	353	191(20), 179(19), 173(40), 135(27)	<i>cis</i> -kryptochlorogenová kyselina	1,73±0,13
4S	7,2	328	353	191(24), 179(28), 173(60), 134(48)	<i>trans</i> -kryptochlorogenová kyselina	2,59±0,23
5S	7,5	328	353	191(100), 179(12), 161(5), 135(20)	<i>cis</i> -chlorogenová kyselina	2,21±0,02
6S	8,0	328	353	191(100), 179(52), 161(5), 135(34)	<i>trans</i> -chlorogenová kyselina	3,66±0,05
7S	15,2	358	625	463(5), 301(100)	Kvercetin- <i>O</i> -dihexosid	0,11±0,01
8S	15,8	352	755	609(33), 301(100)	Kvercetin- <i>O</i> -deoxyhexosyl- <i>O</i> -rutinosid	2,49±0,01
9S	16,6	350	755	593(100), 285(38)	Kaempferol- <i>O</i> -hexosyl- <i>O</i> -rutinosid	1,67±0,01
10S	17,2	354	609	301(100)	Kvercetin-3- <i>O</i> -rutinosid	0,707±0,004
11S	17,6	350	739	593(36), 285(95)	Kaempferol- <i>O</i> -deoxyhexosyl- <i>O</i> - rutinosid	4,7±0,1
12S	17,9	346	755	593(100), 469(50), 285(72)	Kaempferol- <i>O</i> -hexosyl- <i>O</i> -deoxyhexosyl- hexosid	3,0±0,1
13S	18,3	356	769	623(40), 315(100)	Isorhamnetin- <i>O</i> -deoxyhexosid- <i>O</i> - rutinosid	1,57±0,01
14S	19,6	350	593	285(100)	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosid	1,8±0,1
15S	20,6	354	623	315(100)	Isorhamnetin- <i>O</i> -deoxyhexosyl-hexosid	1,31±0,05
16S	23,9	356	623	315(100)	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinosid	0,366±0,007
17S	24,7	350	447	285(100)	Kaempferol-3- <i>O</i> -glukosid	0,45±0,03
18S	25,4	354	477	315(100)	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glukosid	1,5±0,1
19S	26,3	300sh, 334	771	609(51), 301(44)	Kvercetin- <i>O</i> -caffeoyl-rutinosid	0,78±0,02
20S	28,3	296sh, 332	755	593(9), 285(61)	Kaempferol- <i>O</i> -caffeoyl-rutinosid	1,5±0,1
Celkový obsah fenolických kyselin						17,1±0,5
Celkový obsah flavonoidů						22,0±0,3
Celkový obsah fenolických látek						39,1±0,7

Pro všechny estery derivátů hydroxyskořicové kyseliny s chinovou kyselinou a jejich isomery je typický výskyt produktů fragmentace s hodnotou 191 a 173, což odpovídá iontům [chinová–H]⁺ a [chinová–H₂O–H]⁺ kyselina [110].

Sloučenina **5S** byla přiřazena *cis* isomeru 5-*O*-caffeoylchinové kyseliny na základě fragmentů nižší intenzity ve srovnání s daty u píku **6S**. Při určování bylo také vycházeno z faktu, že *cis* deriváty hydroxyskořicové kyseliny se eluují před příslušnými *trans* deriváty z důvodu existence dvou vodíkových můstků u tohoto konformeru. Toto tvrzení bylo odvozeno na základě vyhodnocení spekter produktů hydroxyskořicové kyseliny vystavené UV záření vlnové délky 366 nm po dobu 24 hod [149]. *Cis* a *trans* isomery kryptochlorogenové neboli 4-*O*-caffeoylchinové kyseliny (sloučeniny **3S** a **4S**) a *trans* isomer neochlorogenové neboli 3-*O*-caffeoylchinové kyseliny (sloučenina **1S**) byly rozlišeny a identifikovány dle typických fragmentačních spekter popsanych v literatuře [110, 150].

Jmenované sloučeniny nebyly u zkoumaného rostlinného druhu *Solanum stramonifolium* Jacq. doposud jinými autory popsány.

Z flavonolových derivátů byly v extraktu z listů nalezeny především glykosidy kvercetinů (λ_{\max} kolem 354 nm; MS² fragment *m/z* 301), isorhamnetinů (λ_{\max} kolem 356 nm; MS² fragment *m/z* 317) a kaempferolů (λ_{\max} kolem 348 nm, MS² fragment *m/z* 285).

Sloučeniny jako rutin (kvercetin-3-*O*-rutinosid) nebo kvercetin-3-*O*-glukosyl-rutinosid poskytují neutrální ion *m/z* 179 a neutrální ztráty 162 u a 308 u, které mohou být mylně interpretovány jako důkaz přítomnosti hydroxyskořicové kyseliny. Proto je nutno u spekter obsahujících tyto ztráty negativních iontů a (nebo) neutrálních ztrát zhodnotit UV absorpci. Pokud je maximum mezi 343–350 nm, pak je sloučenina přiřazena k flavonol glykosidům. Je-li v takovém glykosylovaném flavonolu přítomen i derivát hydroxyskořicové kyseliny, bude pozorován také hypochromický posun (310–336 nm) [151].

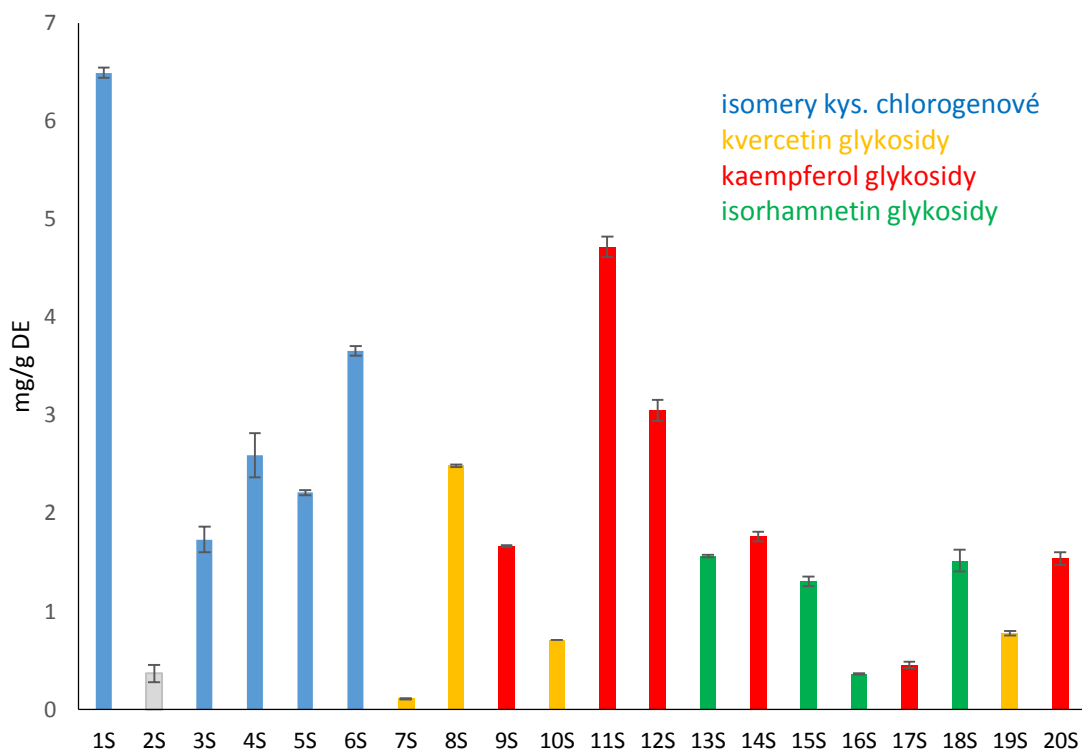
Maxima absorpce všech derivátů hydroxyskořicové kyseliny a jejich konjugátů se pohybovaly mezi 310–330 nm, některé i s maximy mezi 285–305 nm, což odpovídá údajům z literatury pro tyto fenolické sloučeniny [152, 153]. Všechny konjugáty dihydrohydroxyskořicové kyseliny měly absorpční maxima mezi 278–282 nm, někdy s dalším signálem mezi 310–315 nm, což je velmi charakteristické pro konjugáty dihydrocaffeoyl-spermidinu, které byly nalezeny ve stonku a kořeni [32, 154].

Příslušné píky pak byly přiřazeny rutinů (pík **10S**), nikotiflorinu (pík **14S**), narcissinu (pík **16S**), astragalínu (pík **17S**) a isorhamnetin-3-*O*-glukosidu (pík **18S**) na základě porovnání spekter se standardy. U sloučeniny poskytující pík **7S** byla pozorována deproteinovaná molekula $[M-H]^-$ s m/z 625, která poskytovala MS^2 fragment při m/z 301 $[M-H-162-162]^-$, odpovídající ztrátě dvou hexos z aglykonu kvercetinů. To vedlo k identifikaci sloučeniny **7S** jako kvercetin-*O*-dihexosid.

Sloučeniny **8S**, **11S** a **13S** poskytly stejné neutrální ztráty deoxyhexosy (146 u) a deoxyhexosyl-hexosy (308 u), což odpovídá rozdílné pozici těchto skupin na aglykonech kvercetinů, kaempferolu a isorhamnetinu (s $[M-H]^-$ při m/z 755, 739 a 769). Stejně tak MS^2 fragmenty píku **9S** a **12S** odpovídají ztrátě hexosy (m/z 593; -162 u) a deoxyhexosyl-hexosy (m/z 285; -308 u). U píků **8S**, **9S**, **11S** a **13S** lze tedy na základě přítomnosti rutinůsidů ve vzorcích, včetně kvercetin-3-*O*-rutinůsidu, uvažovat rutinůsid, jakožto přítomný fragment deoxyhexosyl-hexosy.

V případě píku **12S** nebylo možno na základě dostupných dat určit cukerné jednotky a jejich polohu na aglykonu, a proto byla sloučenina označena jako kaempferol-*O*-hexosyl-*O*-deoxyhexosyl-hexosid. Sloučenina **15S** ($[M-H]^-$ m/z 623) vykazovala stejný molekulární ion jako sloučenina **16S**, ale při nižším retenčním čase. Zároveň byl pozorován pouze jediný MS^2 fragment (m/z 315; -308 u), což napovídá, že obě cukerné jednotky byly spojeny a sloučenina byla označena jako isorhamnetin-*O*-deoxyhexosyl-hexosid.

Sloučeniny **19S** ($[M-H]^-$ m/z 771) a **20S** ($[M-H]^-$ m/z 755) ve fragmentačním spektru poskytují produktové ionty při m/z 609 a 593, odpovídající v obou případech neutrální ztrátě typické pro caffeoyl (162 u). Aglykon obsahuje tedy acyl fenolické kyseliny. Také delší retenční čas naznačuje tuto strukturu, jelikož zbytek hydroxyskořicové kyseliny zahrnuje pokles polarity, vyvolaný jeho přítomností. Tyto molekuly byly tudíž označeny jako kvercetin-*O*-caffeoyl-rutinůsid a kaempferol-*O*-caffeoyl-rutinůsid.

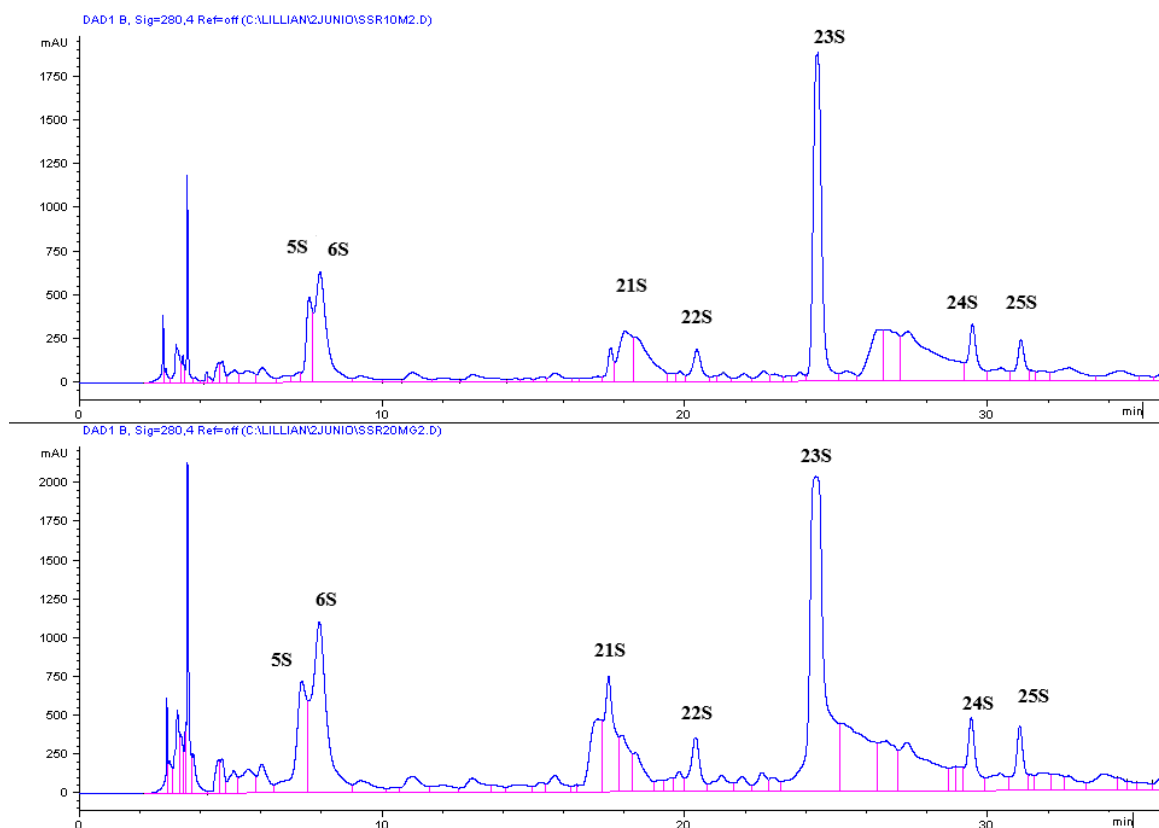


Obrázek 12: Kvantitativní stanovení polyfenolů v listech *S. Stramoniifolium* (mg/g suchého extraktu).

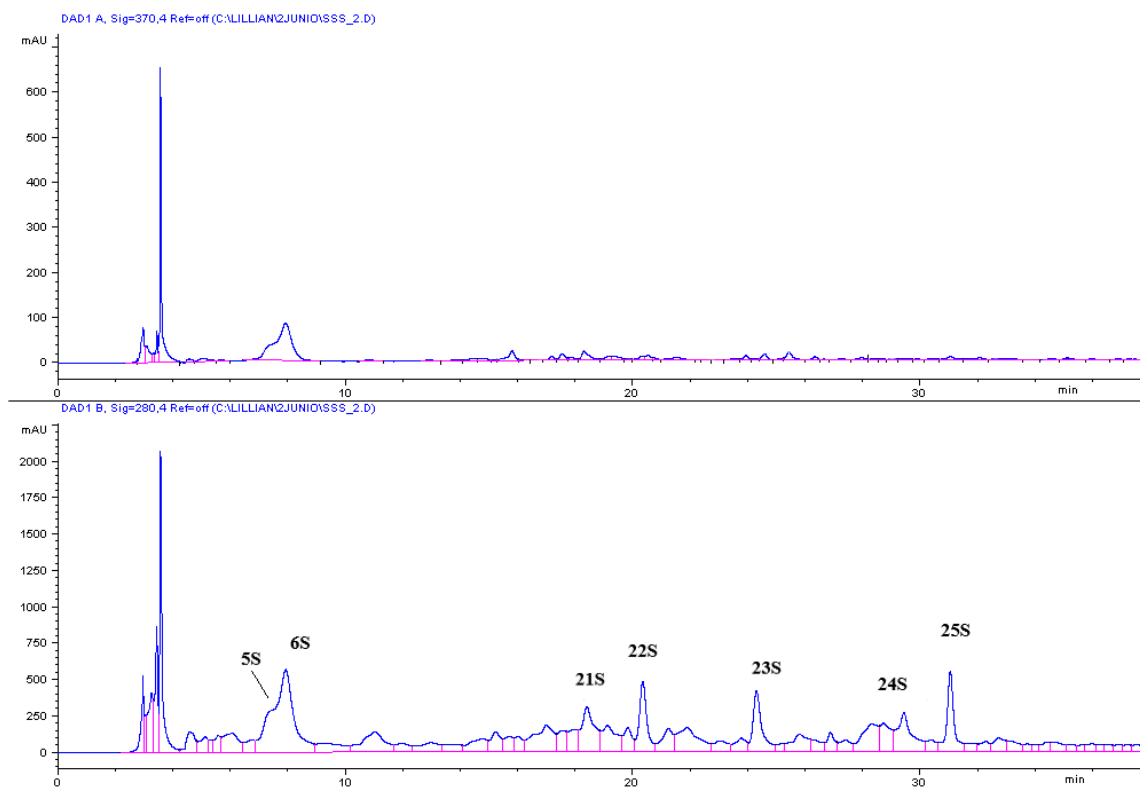
Celkové množství nalezených fenolických kyselin bylo $17,1 \pm 0,5$ mg/g DE a flavonoidů $22,0 \pm 0,3$ mg/g. Obrázek 12 uvádí kvantitativní zastoupení jednotlivých identifikovaných sloučenin v extraktu z listů. Jak je patrné, nejvíce zastoupenou látkou byla kyselina *trans*-neochlorogenová ($6,49 \pm 0,05$ mg/g DE, tj. suchého extraktu).

Isomery kyseliny chlorogenové tvořily majoritní podíl fenolických kyselin. Z flavonoidů dominoval zastoupením kaempferol-*O*-deoxyhexosyl-*O*-rutinosid s $4,7 \pm 0,1$ mg/g DE. Porovnáme-li zastoupení derivátů vycházejících ze tří přítomných aglykonů, pak převažují glykosidy kaempferolu ($13,19 \pm 0,37$ mg/g DE; 60%), následovány glykosidy isorhamnetinu ($4,76 \pm 0,70$ mg/g DE; 22 %) a nejméně byly zastoupeny glykosidy kvercetinu ($4,09 \pm 0,04$ mg/g DE; 18 %).

Extrakty z kořene a stonku si byly profilově, co do zastoupení fenolických kyselin, podobné, ovšem daleko méně pestré, než tomu bylo v případě extraktu z listu. Záznam LC chromatogramů je uveden na obrázku 13 pro kořen a obrázku 14 pro stonku. V extraktu z kořene bylo identifikováno celkem 7 látek, v extraktu ze stonku pak 7 sloučenin. Kvantifikace byla v obou případech provedena z chromatogramu při 370 nm.



Obrázek 13: Stanovení fenolických látek v extraktu z kořene *S. stramonifolium* (280 nm horní chromatogram a 370 nm dolní chromatogram).



Obrázek 14: Stanovení fenolických látek v extraktu ze stonku *S. stramonifolium* (280 nm horní chromatogram a 370 nm dolní chromatogram).

Sloučeniny **5S** a **6S** se objevily v extraktu z kořene i stonku a byly identifikovány jako *cis* a *trans* isomery chlorogenové kyseliny, jak již bylo popsáno výše.

Zatímco deriváty hydroxyskořicové a dihydrohydroxyskořicové kyseliny jsou v rodě *Solanum* známou skupinou fenolických látek s celou škálou biologických aktivit, jejich konjugáty s polyaminy představují méně prozkoumanou skupinu látek. Narváez-Cuenca a kol. [155] popsal překvapivě velké zastoupení těchto konjugátů u různých odrůd bramboru (*S. tuberosum*), které může představovat až 21 % z celkového zastoupení fenolických kyselin. To podporuje nalezení hned několika konjugátů dihydrokávové kyseliny se spermidinem v extraktu z kořenů a potažmo i ve stonku, které se v extraktu z listů neobjevily. Přestože spermidin patří mezi alifatické polyaminy, jeho výskyt v konjugované formě s deriváty hydroxyskořicové kyseliny je pro rod *Solanum* celkem běžný [155]. Jejich detekce byla u zkoumané rostliny zaznamenána poprvé, a proto jim bude věnována pozornost. Sloučeniny **21S**, **24S** a **25S** ($[M-H]^-$ m/z 472) byly identifikovány jako konjugáty dihydrokávové kyseliny s polyaminem spermidinem, a to konkrétně isomery *N,N'*-bis(dihydrocaffeoyl)spermidinu, jak popsal dříve Parr a kol. [32]. Podobně byl identifikován pík **23S** ($[M-H]^-$ m/z 637) jako *N,N',N''*-tris(dihydrocaffeoyl)spermidin a pík **22S** jako jeho hexosid tak, jak uvádí Gancel a kol. [154]. Parr a kol. [32] zmiňuje, že existuje pouze jediný isomer pro tris(dihydrocaffeoyl)spermidin, a to v konfiguraci *N¹,N⁴,N⁸*-tris(dihydrocaffeoyl)spermidin. To potvrzuje i Forero a kol. [156], kteří izolovali tento fenylamid z rostliny *Solanum quitoense* a označili jej jako zdroj hořké chuti plodu. Lze tedy předpokládat, že se jedná o tuto sloučeninu, nicméně sloučeninu by bylo nutno izolovat a podrobit další strukturální analýze.

Sloučenina **22S** $[M-H]^-$ m/z 799 poskytuje MS^2 fragment m/z 637 $[M-H-162]^-$ typický právě pro odtržení hexosy. Nicméně nebylo možné určit přesnou pozici dihydrocaffeoylových skupin na spermidinovém skeletu.

Sloučenina **23S** byla kvantitativně nejvíce zastoupenou látkou v kořeni, zatímco ve stonku to byl její hexosid (**22S**). Její množství bylo v kořeni 9krát vyšší než ve stonku (obrázek 15). Na druhou stranu, v listech nebyl žádný z derivátů spermidinu detekován.

Tabulka 19 Kvalitativní a kvantitativní stanovení fenolických látek v extraktu z kořene a stonku rostliny *Solanum stramonifolium*.

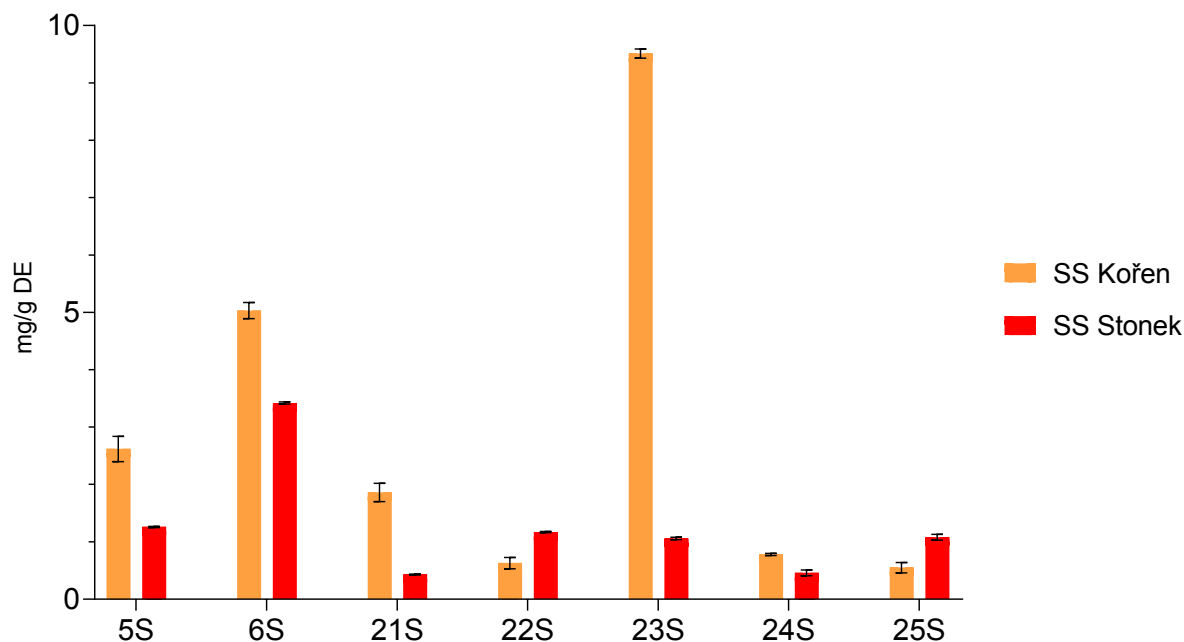
Pík	R _t (min)	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Identifikace	Kvantifikace (mg/g DE)	
						Kořen	Stonk
5S	7,3	328	353	191(100), 179(12), 161(5), 135(20)	<i>cis</i> -chlorogenová kyselina	2,62±0,22 ^a	1,26±0,01 ^b
6S	7,9	328	353	191(100), 179(52), 161(5), 135(34)	<i>trans</i> -chlorogenová kyselina	5,03±0,14 ^a	3,42±0,02 ^b
Celkový obsah fenolických kyselin						7,65±0,36^a	4,68±0,01^b
21S	17,4	236, 296, 320sh	472	350(40), 308(31)	Bis(dihydrocaffeoyl) spermidin isomer 1	1,86±0,16 ^a	0,43±0,01 ^b
22S	20,3	226, 294, 322sh	799	637(100), 515(6), 472(10), 350(3), 308(3)	Tris(dihydrocaffeoyl) spermidin hexosid	0,63±0,10 ^a	1,17±0,01 ^b
23S	24,3	284	636	515(23), 472(47), 350(15), 308(8)	Tris(dihydrocaffeoyl) spermidin	9,51±0,08 ^a	1,06±0,02 ^b
24S	29,4	226, 284, 316sh	472	350(32), 308(38)	Bis(dihydrocaffeoyl) spermidin isomer 2	0,78±0,02 ^a	0,46±0,05 ^b
25S	31,1	226, 292, 320sh	472	350(30), 308(48)	Bis(dihydrocaffeoyl) spermidin isomer 3	0,55±0,09 ^a	1,08±0,05 ^b
Celkový obsah fenylamidů						13,33±0,45^a	4,21±0,02^b
Celkový obsah fenolických látek						20,98±0,81^a	8,89±0,01^b

*hodnoty s různým indexem ve stejném řádku jsou statisticky odlišné na hladině významnosti $p < 0,05$

Jelikož v literatuře bývá výskyt těchto látek uváděn zejména v oddencích rostlin rodu *Solanum*, podporují získané výsledky selektivní výskyt zmíněné skupiny konjugátů na podzemní části rostliny [155].

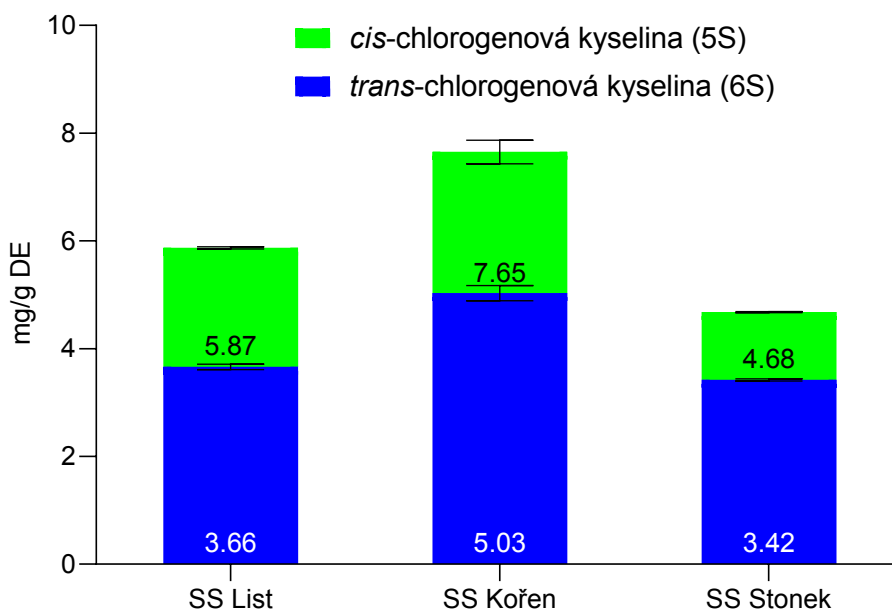
Extrakt z kořene obsahoval větší množství každého z isomerů kyseliny chlorogenové než extrakt ze stonku. Pro zajímavost bylo zhodnoceno procentuální zastoupení obou isomerů v listu, stonku a kořeni.

Obrázek 16 graficky podtrhuje, že ačkoli se obsah izomerů liší, jejich poměr zůstává vcelku konstantní, konkrétně procentuálně pro *trans* a *cis* isomer v kořeni, stonku a listu pak 66:34; 73:27 a 62:38).



Obrázek 15: Kvantitativní zastoupení polyfenolů v kořeni a stonku *S. Stramonifolium*

Biosyntézou je produkován majoritně *trans* isomer, nicméně při oxidačním stresu a zejména po vystavení tkání UV paprskům se poměr *cis* isomeru zvyšuje [150]. Pokusy s tkáňovými kulturami dokázaly, že k tvorbě *cis* isomerů dochází i bez expozice UV paprskům [157].



Obrázek 16: Zastoupení *cis/trans* isomerů kyseliny chlorogenové v jednotlivých částech *S. stramonifolium*

Celkově lze shrnout, že flavonoidy byly nejvíce zastoupenou skupinou fenolických sloučenin identifikovaných v jednotlivých částech zkoumané rostliny *S. stramonifolium* Jacq. Vedle toho, v extraktech z kořene a stonku dominovaly konjugáty dihydrokávové kyseliny s polyaminy – konkrétně se spermidiny.

Ačkoli byla přítomnost spermidinů popsána u několika zástupců rodu *Solanum*, příkladem budiž lilek brambor (*S. tuberosum*) nebo naranjilla (*S. quitoense*), u zkoumané rostliny *Solanum stramonifolium* doposud identifikovány nebyly [154, 155].

5.6 Biologická aktivita SS

Hrubé extrakty z listů, plodů, stonků a kořenů rostliny *Solanum stramonifolium* Jacq., (SS) připravené v 80% ethanolu, byly testovány pomocí série vybraných testů biologické aktivity tak, aby byla ověřena jejich účinnost a potenciál pro použití v potravinářském průmyslu. Dále byla zhodnocena jejich potenciální toxicita.

5.6.1 Antimikrobiální aktivita SS

Všechny připravené extrakty byly otestovány vůči vybraným klinickým izolátům zastupujících jak grampozitivní, tak gramnegativní kmeny bakterií.

Acinetobacter baumannii, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*, jsou známy jako multirezistentní kmeny a řazeny do tzv. ESKAPE patogeny (skupina zahrnuje druhy *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter*) [158]. Je známo, že gramnegativní bakterie vykazují častější rezistenci, než je tomu u grampozitivních kmenů, a to díky přítomnosti vnější membrány, bohaté na lipopolysacharidy [159].

Tabulka 20 shrnuje výsledky získané v testu za použití bujónové mikrodiluční metody s INT kolorimetrickým vyhodnocením. Jak je patrné, u všech extraktů byla zachycena antimikrobiální aktivita. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) se pohybovala v rozmezí 2,5 až 20 mg/ml. Ve dvou případech byla MIC vyšší než maximální testovaná koncentrace, extrakt ze stonku proti bakteriím *A. baumannii* a *P. aeruginosa*. Obecně byly grampozitivní bakterie vůči extraktům citlivější než gramnegativní bakterie, což je obvyklé vzhledem k rozdílné stavbě a chování těchto dvou skupin bakterií.

Tabulka 20 Antibakteriální aktivita hrubých extraktů *Solanum stramonifolium*

Mikroorganismus	MIC (mg/ml)			
	Plod	List	Kořen	Stonek
Grampozitivní kmeny				
MRSA	20	5	10	5
MSSA	20	5	10	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	5	10	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5	20	10	2,5
Gramnegativní kmeny				
<i>Acinetobacter baumannii</i>	20	10	10	>20
<i>Escherichia coli</i>	20	5	10	20
<i>Escherichia coli</i> ESBL	20	5	10	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	5	10	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL	20	5	10	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	10	20	>20

MRSA = methicilin-resistentní *Staphylococcus aureus*; MSSA = methicilin-senzitivní *Staphylococcus aureus*; ESBL = producenti širokospektrých β -laktamáz; MIC = minimální inhibiční koncentrace

Nicméně extrakt z kořene vykázal širokospektrou neselektivní inhibici vůči oběma skupinám u 9 z 10 kmenů poskytnutím shodných MIC (10 mg/ml). Na druhou stranu byl extrakt ze stonku mnohem účinnější proti grampozitivním kmenům (2,5 – 10 mg/ml). *Listeria monocytogenes* byla nejcitlivějším kmenem a v testu byly získány nejnižší hodnoty MIC u extraktu z plodu a ze stonku (2,5 mg/ml). Naproti tomu byla *P. aeruginosa* nejméně inhibovaným organismem v testu. Celkově dopadl v testu nejlépe extrakt z listu, který inhiboval 7 klinických izolátů při koncentraci 5 mg/ml. Také stojí za zmínku, že u bakterií s vyšším stupněm rezistence, a to methicilin-resistentní *S. aureus* (MRSA) či β -laktamázy produkující *E. coli* a *K. pneumoniae*, nebyla

pozorována vyšší MIC ve srovnání s jejich citlivějšími analogy. Tato skutečnost by mohla být velice významná nejen pro potravinářský průmysl, ale také při vývoji antibiotik ve farmaceutickém průmyslu. Širokospektrý účinek byl již pozorován u vodného extraktu ze semen *S. stramonifolium* (Thajsko) vůči několika bakteriálním kmenům - *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Xanthomonas* sp., *Salmonella typhi*). Nicméně *E. coli* a *K. pneumoniae* v těchto testech diskovou difuzní metodou inhibovány nebyly [34]. Za tento účinek mohou být zodpovědné fenolické látky již dříve izolované v rostlinách rodu *Solanum* a vykazující antimikrobiální účinky, např. nikotiflorin, rutin a chlorogenová kyselina a její analogy [160], stejně jako další flavonoidy, které byly potvrzeny v testovaných extraktech, jmenovitě kvercetin či kaempferol [129].

5.6.2 Antioxidační aktivita SS

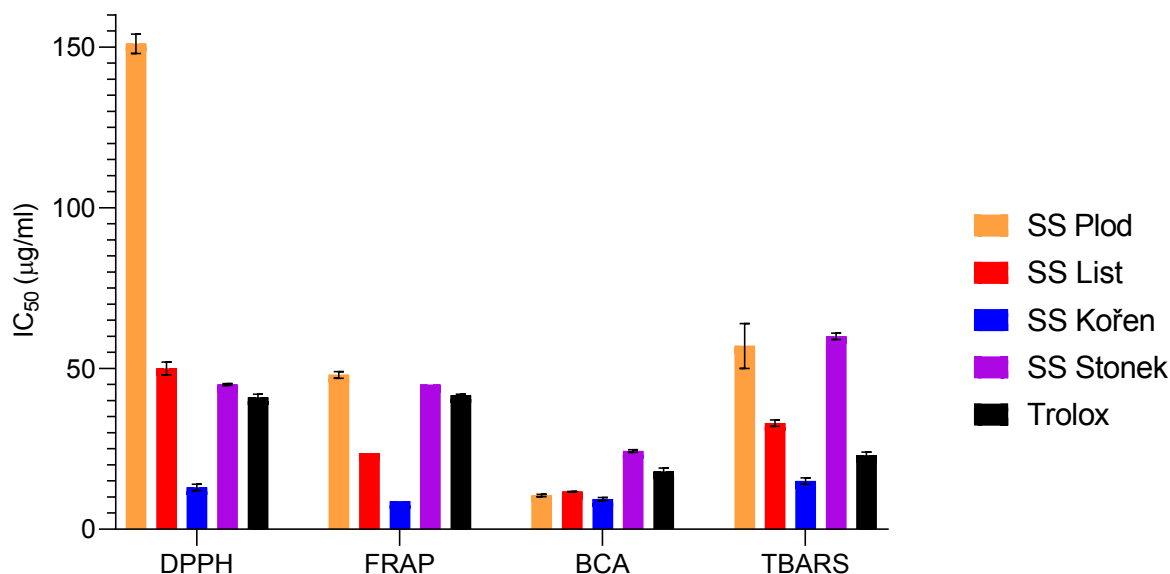
Antioxidační aktivita byla stanovena použitím čtyř *in vitro* testů zahrnujících několik mechanismů, zejména přenos atomu vodíku (HAT) a přenos singletového elektronu (SET), aby mohla být plně posouzena antioxidační kapacita studovaných vzorků [77]. Jednalo se o testovací metody DPPH; FRAP, BCA a TBARS, jejichž detailní popis a metodika jsou uvedeny v předchozích kapitolách.

Tabulka 21 Antioxidační aktivita extraktů (80% ethanol) z různých částí rostliny *Solanum stramonifolium*

<i>Antioxidační aktivita (IC₅₀= µg/ml)</i>					
	Plod	List	Kořen	Stonek	Trolox
DPPH	151±3 ^a	50±2 ^b	13±1 ^c	74±4 ^b	41±1 ^d
FRAP	48±1 ^a	23,7±0,1 ^b	8,68±0,03 ^c	45±0,3 ^{a,d}	41,7±0,3 ^d
BCA	10,5±0,4 ^a	11,7±0,1 ^a	9,4±0,5 ^a	24,3±0,4 ^b	18±1 ^c
TBARS	57±7 ^a	33±1 ^b	15±1 ^c	60±1 ^a	23±1 ^d

^a Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměr ± směrodatná odchylka (n = 9), hodnoty s různým indexem ve stejném řádku jsou statisticky odlišné na hladině významnosti p < 0,05

Z dat v tabulce 21 vyplývá, že extrakty ze všech testovaných částí rostliny mají silný antioxidační potenciál. Ve srovnání s ostatními extrakty dosahoval extrakt z kořenů nejlepších hodnot. Byl dokonce účinnější než komerčně používaný standard Trolox, protože poskytoval nižší IC₅₀ ve všech čtyřech testech.



Obrázek 17: Antioxidační aktivita extraktů *S. stramonifolium*. Použitý standard: Trolox

V testu s DPPH klesala aktivita extraktů jednotlivých částí rostliny v řadě kořen > list > stonek > plod s odpovídajícími hodnotami IC_{50} 13 ± 1 ; 50 ± 2 ; 74 ± 4 a 151 ± 3 $\mu\text{g/ml}$. U testu FRAP dosáhly lepších výsledků než Trolox ($IC_{50} = 41,7 \pm 0,3$ $\mu\text{g/ml}$) dokonce dva extrakty: kořen a list (IC_{50} $8,68 \pm 0,03$ a $23,7 \pm 0,1$ $\mu\text{g/ml}$). Aktivita u tohoto testu klesala obdobně jako u DPPH, a to v řadě kořen > list > stonek > plod. Extrakty z kořene a listu předčily Trolox i v BCA testu, kde potvrdily silnější schopnost inhibovat zhášení β -karotenu; tentokrát spolu s extraktem z plodu, pro který je toto jediný případ lepších výsledků než u standardu (viz obrázek 17). Metoda BCA byla tudíž zhodnocena jako nejcitlivější vůči extraktům z rostliny *S. stramonifolium*. Naproti tomu, u TBARS inhibičního testu dokázal antioxidační potenciál Troloxu předčit pouze extrakt z kořene (IC_{50} 15 ± 1 $\mu\text{g/ml}$). V tomto případě byl nejméně účinným extrakt ze stonku. Celkově lze shrnout, že extrakty z rostliny *S. stramonifolium* se lišily v antioxidační aktivitě jednak dle části rostlinného těla, ale také dle použité metody a mechanismu účinku. Jelikož se jedná o hrubé extrakty, je možno považovat výsledky zejména u stonku a listu za velmi slibné, jelikož dosahovaly hodnot čisté látky standardu Trolox. Proto by další studium mělo být zaměřeno zejména na tyto části rostliny.

V literatuře není mnoho zmínek o biologické aktivitě této rostliny. Wetwitayaklung a Phaechamud [30] zjistili u methanolického extraktu *S. stramonifolium* nízký antioxidační potenciál v TEAC testu s použitím

ABTS^{·+} radikálu ($IC_{50} = 1133,08 \mu\text{g}$ ve srovnání s $10,14 \mu\text{g}$ pro Trolox) a přisoudili jej nízkému obsahu celkových fenolických látek ($1,55 \text{ g}$ ekvivalentu gallové kyseliny/ 100 g extraktu). Produkty lipidové peroxidace, jako například malondialdehyd, mohou spolu s volnými radikály způsobit poškození důležitých buněčných komponent od DNA, proteinů, až po lipidy, a tím přispět nepříznivě ke vzniku patologických procesů, včetně stárnutí, rakoviny, kornatění cév, ischemické choroby srdeční či neurodegenerativním procesům [161]. Přestože endogenní antioxidační systémy jsou efektivní, je nutno dodávat v případě zvýšeného oxidačního stresu antioxidanty z vnějších zdrojů. V rámci prevence je tudíž vhodné podávat pravidelně antioxidanty v potravě nebo jako doplněk stravy, aby byl oxidační stres limitován. Mezi takové suroviny patří také rostlinné extrakty bohaté na fenolické látky.

5.6.3 Protizánětlivá aktivita SS

Jak je uvedeno v tabulce 22, ze všech testovaných částí rostlin, byla zachycena protizánětlivá aktivita pouze u extraktu z kořene ($IC_{50} = 100 \pm 6 \mu\text{g/ml}$). Ovšem tato hodnota byla o řád vyšší než standard dexamethason ($IC_{50} = 16 \pm 1 \mu\text{g/ml}$).

Tabulka 22 Protizánětlivá aktivita extraktů (80% ethanol) z různých částí rostliny *Solanum stramonifolium*

Protizánětlivá aktivita ($IC_{50} = \mu\text{g/ml}$)					
	Plod	List	Kořen	Stonek	Dexamethason
Produkce oxidu dusíku (NO)	>400	>400	100 ± 6^a	>400	16 ± 1^b

^a Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměr \pm směrodatná odchylka ($n = 9$), hodnoty s různým indexem ve stejném řádku jsou statisticky odlišné na hladině významnosti $p < 0,05$

Produkce NO nebyla u všech ostatních vzorků inhibována až do testované maximální koncentrace $400 \mu\text{g/ml}$. Vzhledem k tradičnímu vnějšímu užití listů při zánětech je možno konstatovat, že v tomto případě se na účinku podílí jiný mechanismus protizánětlivého účinku než inhibice produkce NO a je třeba tuto aktivitu posoudit odlišným typem testu.

5.6.4 Antikarcinogenní aktivita a cytotoxicita SS

Více než 60 % farmaceutik, používaných při léčbě rakoviny, pochází z přírodních zdrojů, a to zejména z rostlin [162]. Rod *Solanum* je velmi bohatým zdrojem látek s protinádorovým účinkem, mezi nejznámější patří solanin a solamargine [163, 164]. Z uvedeného důvodu byl mezi vybrané aktivity zařazen také test hodnotící antikarcinogenní účinek. Pro test byly vybrány čtyři

lidské nádorové buněčné linie, konkrétně MCF-7 (karcinom prsu), NCI-H460 (karcinom plic), HeLa (karcinom děložního čípku) a HepG2 (hepatocelulární karcinom). Jako důležitý parametr byl simultánně proveden také test na cytotoxicitu s použitím kultury nerakovinotvorné primární buněčné linie z vepřových jater PLP2. Data jsou rovněž shrnuta v tabulce 23.

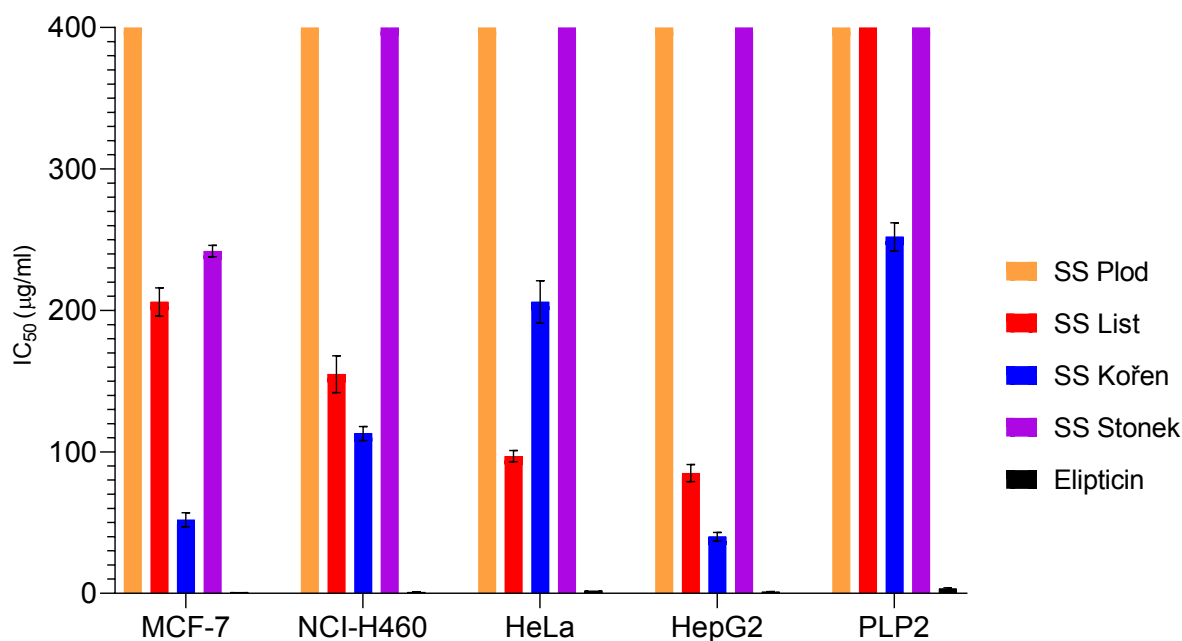
Tabulka 23 Antikarcinogenní a cytotoxická aktivita extraktů *S. stramoniiifolium*

<i>Cytotoxicita u nádorových buněčných linií (IC₅₀ = µg/ml)</i>					
Buněčná linie	Plod	List	Kořen	Stonek	Elipticin
MCF-7 (karcinom prsu)	>400	206±10 ^a	52±5 ^b	242±4 ^c	0,91±0,04 ^d
NCI-H460 (karcinom plic)	>400	155±13 ^a	113±5 ^b	>400	1,0±0,1 ^c
HeLa (karcinom děložního čípku)	>400	97±4 ^a	206±15 ^b	>400	1,91±0,06 ^c
HepG2 (hepatocelulární karcinom)	>400	85±6 ^a	40±3 ^b	>400	1,1±0,2 ^c
<i>Cytotoxicita u nenádorové buněčné linie IC₅₀ = µg/ml)</i>					
PLP2	>400	>400	252±10 ^a	>400	3,2±0,7 ^b

^a Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměr ± směrodatná odchylka (n = 9), hodnoty s různým indexem ve stejném řádku jsou statisticky odlišné na hladině významnosti p < 0,05

Z výsledků vyplývá, že extrakt z listu a kořene inhibovaly všechny nádorové buněčné linie. Nejvyšší inhibice bylo dosaženo u linie HepG2 s nejnižší hodnotou inhibiční koncentrace IC₅₀ (40 ± 3 µg/ml pro kořen a 85 ± 6 µg/ml pro list). Extrakt ze stonku účinkoval pouze na buněčnou linii MCF-7 (IC₅₀ = 242 ± 4 µg/ml) a u extraktu z plodu se nepodařilo zachytit IC₅₀ ani do maximální koncentrace. Z pohledu použitých kultur se jako nejcitlivější jeví buněčná linie karcinomu prsu MCF-7, jež byla inhibována třemi ze čtyř extraktů v pořadí účinnosti kořen > list > stonek. Obrázek 18 shrnuje graficky účinnost jednotlivých extraktů v tomto testu. Pro přehlednost bylo u vzorků, u nichž nebyla v koncentračním rozmezí zachycena IC₅₀, vynesena jako ekvivalentní hodnota 400 µg/ml.

Za povšimnutí stojí, že oproti extraktu z listu poskytl extrakt z kořene nižší hodnoty IC₅₀ u HepG2, MCF-7 i NCI-H460, ale byl méně účinný vůči HeLa. Ve srovnání se standardem elipticinem byly výsledky nejméně o řád vyšší, tudíž průměrné. Nicméně elipticin je jednak čistá látka s vysokým účinkem proti všem použitým buněčným liniím, ale na druhé straně s vysokou hepatotoxicitou vůči nerakovinotvorným buňkám v testu s PLP2 primární buněčnou linií.



Obrázek 18: Antikarcinogenní aktivita *S. stramonifolium*. U hodnot $IC_{50} > 400 \mu\text{g/ml}$ byla v grafu záměrně vyznačena maximální hodnota sloužící k porovnání míry aktivity vzorků. Použitý standard v testu: elipticin

Na druhé straně použité extrakty nepřekročily u PLP2 hodnoty, které byly získány pro nádorové buněčné linie. Extrakt z kořene byl kupříkladu středně toxický vůči PLP2 ($IC_{50} = 252 \pm 10 \mu\text{g/ml}$), ale aktivní koncentrace u nádorových linií byly o řád nižší nebo lehce nižší, a to $40 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ pro HepG2; $52 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ pro MCF-7; $113 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ pro NCI-H460 a $206 \pm 15 \mu\text{g/ml}$ in HeLa). Z tohoto důvodu se jeví jako slibnější kandidát pro použití v potravinářském průmyslu spíše extrakt z listu *S. stramonifolium*, jelikož na rozdíl od extraktu z kořene nebyl zaznamenán toxický účinek v PLP2 testu až do hladiny $400 \mu\text{g/ml}$, která je považována za orientační hraniční hodnotu pro preliminární testy tohoto účelu.

Přesto je nutno počítat s možností synergního působení obsažených sloučenin v matici hrubého extraktu. V literatuře bylo potvrzeno, že obecně mají hrubé extrakty ve srovnání s čistými izolovanými sloučeninami obvykle nízkou toxicitu. Proto si v potravinářském a farmaceutickém průmyslu začínají opět nacházet své místo právě hrubé extrakty, i přes problémy standardizace a udržení kvality jednotlivých extraktů, které jsou závislé na více faktorech [1].

6. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Přínos pro vědu:

- Byly provedeny detailní studie biologické aktivity extraktů *Momordica charantia* L a *Solanum stramonifolium* Jacq., které přispějí k vědeckému poznání těchto doposud málo prozkoumaných tropických rostlin.
- U obou rostlin byla stanovena toxicita na primární buněčné linii, na jejímž základě byly vybrány extrakty vhodné pro potravinářský průmysl.
- V 80% ethanolovém extraktu *M. charantia* bylo 6 fenolických látek identifikováno poprvé.
- U rostliny *S. stramonifolium* byla poprvé u tohoto druhu popsána přítomnost biologicky aktivních látek také selektivně v jednotlivých částech rostliny.
- U obou rostlin byl pozorován širokospektrální inhibiční účinek vůči senzitivním i rezistentním klonickým izolátům bakterií. To naznačuje přítomnost látek schopné obejít rezistenční mechanismy testovaných bakterií.
- U extraktu z kořene *S. stramonifolium* byla zjištěna antioxidační aktivita silnější než u standardu Trolox, což dokazuje silný antioxidační potenciál pro použití extraktu v potravinářství.

Přínos pro praxi:

- Získané výsledky potvrdily potenciál vybraných tropických rostlin pro vývoj nových funkčních potravin, po nichž se výrazně zvyšuje poptávka.
- Připravené extrakty potvrdily možný vysoký biologický potenciál v udržování zdraví konzumentů pomocí prevence oxidačního stresu a civilizačních chorob s ním souvisejících (zánětlivá onemocnění, kardiovaskulární nemoci, neurodegenerativní procesy, rakovina).
- Díky zjištěné antimikrobiální a antioxidační aktivitě mohou být extrakty prospěšné pro zachování bezpečnosti a trvanlivosti potravin kontrolou nežádoucích kmenů ve výrobku a zpomalení procesů oxidace citlivých molekul.
- Kvantifikace přítomných látek v extraktu může sloužit pro standardizaci komerčně vyvíjených extraktů vhodných pro potravinářský průmysl.

7. ZÁVĚR

Stoupající zájem konzumentů o fortifikované potraviny, které vykazují pozitivní vliv na zdraví a předcházejí chronickým chorobám, motivuje výrobce k vývoji nových produktů. Také zvyšující se preference spotřebitelů směrem k přírodním surovinám udává trend v nahrazování syntetických přídatných látek za látky přírodního původu. Vývoj standardizovaných rostlinných extraktů, které splňují tyto zdravotní požadavky a zároveň napomáhají udržení bezpečnosti potravin z hlediska trvanlivosti a možné kontaminace během výroby, a to bez vedlejších negativních účinků na lidské zdraví (jako je tomu u mnoha syntetických přídatných látek), je stále ještě na svém začátku.

Testovány byly dvě rostliny, planá varieta *Momordica charantia* L. a *Solanum stramonifolium* Jacq., z nichž bylo připraveno celkem pět extraktů v 80% ethanolu (MCH nadzemní část, SS plod, SS list, SS kořen a SS stonek).

Z důvodu bližšího poznání přítomných biologicky aktivních látek byly metodou LC–MS v extraktech stanoveny fenolické látky. Identifikovány byly látky, u nichž byl již dříve popsán silný antioxidační, protizánětlivý, antimikrobiální či antikarcinogenní účinek. Jednalo se zejména o deriváty kyseliny chinové a dále deriváty kvercetinu, kaempferolu a isorhamnetinu, jak u *M. charantia*, tak u *S. stramonifolium* (list). Zajímavé bylo zjištění obdobného profilu látek v kořeni a stonku *S. stramonifolium*, konkrétně přítomnost dihydrocaffeoylspermidinů. Ty byly ve zmíněné rostlině identifikovány poprvé, ač jsou známými metabolity rodu *Solanum*, např. popsané v hlízách brambor (*S. tuberosum*). V extraktu z kořene bylo nalezeno vysoké množství tris(dihydrokaffeoyl)spermidinu ($9,51 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$ suchého extraktu, tj. DE), zatímco ve stonku bylo této látky podstatně méně ($1,06 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$ DE). Z fenolických kyselin dominovala *trans*-chlorogenová kyselina ($5,03 \pm 0,14 \mu\text{g/g}$ DE v kořeni a $3,42 \pm 0,02 \mu\text{g/g}$ DE ve stonku, zatímco v listu to byla *trans*-neochlorogenová kyselina s $6,49 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$ DE. Z flavonoidů byl v listu nejvíce zastoupen flavonoid kaempferol-*O*-deoxyhexosyl-*O*-rutinosid ($4,7 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ DE).

U studované plané variety *M. charantia* bylo šest sloučenin identifikováno poprvé (5-*O*-feruoylchinová kyselina, isokvercitrin, kaempferol-*O*-pentosylhexosid, kvercetin-*O*-acetylhexosid, kaempferol-*O*-acetylhexosid, isorhamnetin-*O*-acetylhexosid). Nejvíce zastoupenou sloučeninou v extraktu této rostliny byl kvercetin-*O*-pentosylhexosid ($7,78 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ DE).

Z pohledu biologické aktivity se jako nejslibnější jevil extrakt z kořene *S. stramonifolium*, který byl vysoce aktivní ve všech testech. Ve všech čtyřech testech antioxidační aktivity dokonce dosahoval lepších výsledků než standard Trolox. Jako jediný také tento extrakt vykázal protizánětlivou aktivitu ($IC_{50} = 100 \pm 6 \mu\text{g/ml}$). Nicméně byl shledán pro svou toxicitu vůči primární buněčné linii ($IC_{50} = 252 \pm 10 \mu\text{g/ml}$) jako nevodný pro použití v potravinářství. Extrakt z listu stejné rostliny vykázal slibnou antioxidační a antikarcinogenní aktivitu, navíc proti klinickým izolátům bakterií byl účinnější.

Extrakt *M. charantia* byl také efektivní ve všech testech, i když nedosáhl takové aktivity jako kořen *S. stramonifolium*. Výhodou je ovšem nízká toxicita MCH ($IC_{50} = 400 \mu\text{g/ml}$). Za zmínku jist stojí inhibice bakterie *L. monocytogenes*, u níž bylo dosaženo vůbec nejnižší účinné koncentrace ve všech testech ($MIC = 0,625 \mu\text{g/ml}$). Celkově byl extrakt MCH účinnější vůči klinickým izolátům bakterií než extrakty *S. stramonifolium*.

Extrakt z plodu byl z pohledu biologické aktivity nejméně perspektivní, byla zachycena pouze antioxidační aktivita. Zajímavým byla však silná inhibice gram pozitivní bakterie *Listeria monocytogenes* ($MIC = 2,5 \mu\text{g/ml}$). V extraktu z plodu nebylo možno identifikovat žádné konkrétní fenolické látky použitou standardní metodou.

Rostliny *Momordica charantia* L. a *Solanum stramonifolium* Jacq., divoce rostoucí v přírodě tropických ostrovů Trinidadu a Tobaga, jsou slibnými zdroji nových biologicky aktivních látek, což potvrdily extrakty z tradičně používaných částí rostlin v sérii testů, zkoumajících jejich antioxidační, protizánětlivé, antikarcinogenní a antibakteriální vlastnosti.

Provedené testy umožnily výběr extraktu *M. charantia* (nadzemní část) a *S. stramonifolium* (list) jakožto vhodných kandidátů pro potravinářský průmysl. Nicméně další selektivní testy budou třeba k schválení vyvíjených produktů.

Výsledky této práce obohatí znalosti o méně zkoumaných druzích tropických rostlin, které obvykle díky environmentálně náročnému prostředí vykazují vyšší biologickou aktivitu sekundárních metabolitů, které produkují k obraně a přežití.

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Základní kameny derivátů kyseliny chlorogenové</i>	21
<i>Obrázek 2: Základní skelet flavonoidů: flavan</i>	22
<i>Obrázek 3: Příklady konjugátů fenolických kyselin s polyaminem spermidinem [54]</i>	24
<i>Obrázek 4: Reakční mechanismus zhášení radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) antioxidantem a typická změna barvy (detekce při 517 nm)</i>	32
<i>Obrázek 5: Princip tvorby chromogenního aduktu v TBARS metodě</i>	34
<i>Obrázek 6: Standardy pro LC-MS analýzu</i>	49
<i>Obrázek 7: Stanovení fenolických látek v extraktu Momordica charantia L. (280 nm horní chromatogram a 370 nm dolní chromatogram)</i>	53
<i>Obrázek 8: Kvantitativní zastoupení polyfenolů v extraktu Momordica charantia</i>	56
<i>Obrázek 9: Antioxidační aktivita extraktu Momordica charantia. Použitý standard: Trolox</i>	63
<i>Obrázek 10: Antikarcinogenní aktivita extraktu Momordica charantia U hodnot $IC_{50} > 400 \mu\text{g/ml}$ byla v grafu záměrně vyznačena maximální hodnota sloužící k porovnání míry aktivity vzorků. Použitý standard v testu: elipticin</i>	67
<i>Obrázek 11: Stanovení fenolických látek v extraktu z listu S. Stramoniiifolium (280 nm horní chromatogram a 370 nm dolní chromatogram)</i>	70
<i>Obrázek 12: Kvantitativní stanovení polyfenolů v listech S. Stramoniiifolium (mg/g suchého extraktu)</i>	74
<i>Obrázek 13: Stanovení fenolických látek v extraktu z kořene S. stramoniiifolium (280 nm horní chromatogram a 370 nm dolní chromatogram)</i>	75
<i>Obrázek 14: Stanovení fenolických látek v extraktu ze stonku S. stramoniiifolium (280 nm horní chromatogram a 370 nm dolní chromatogram)</i>	75
<i>Obrázek 15: Kvantitativní zastoupení polyfenolů v kořeni a stonku S. Stramoniiifolium</i>	78
<i>Obrázek 16: Zastoupení cis/trans isomerů kyseliny chlorogenové v jednotlivých částech S. stramoniiifolium</i>	78
<i>Obrázek 17: Antioxidační aktivita extraktů S. stramoniiifolium Použitý standard: Trolox</i>	82
<i>Obrázek 18: Antikarcinogenní aktivita S. stramonifolium U hodnot $IC_{50} > 400 \mu\text{g/ml}$ byla v grafu záměrně vyznačena maximální hodnota sloužící k porovnání míry aktivity vzorků. Použitý standard v testu: elipticin</i>	85

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Taxonomická klasifikace rostliny <i>Momordica charantia</i> L.	15
Tabulka 2 Taxonomická klasifikace rostliny <i>Solanum stramonifolium</i> Jacq. ..	17
Tabulka 3 Základní třídy polyfenolických látek	19
Tabulka 4 Základní fenolické kyseliny a jejich vybrané deriváty (upraveno dle Nováková a kol. [41])	20
Tabulka 5 Základní třídy flavonoidů	22
Tabulka 6 Kultivační podmínky mikroorganismů	42
Tabulka 7 Izoláty oportunních lidských patogenů	42
Tabulka 8 Kalibrační údaje standardů pro LC-MS analýzu	50
Tabulka 9 Výtěžnost extraktu <i>Momordica charantia</i> po lyofilizaci.....	52
Tabulka 10 Kvalitativní a kvantitativní stanovení fenolických látek v extraktu <i>Momordica charantia</i> metodou LC-MS/MS	54
Tabulka 11 Test rezistence grampozitivních bakterií vůči antibiotikům	58
Tabulka 12 Test rezistence gramnegativních bakterií vůči antibiotikům	59
Tabulka 13 Antibakteriální aktivita extraktu (80% ethanol) z planě rostoucí rostliny <i>Momordica charantia</i> proti vybraným klinickým izolátům bakterií	60
Tabulka 14 Biologická aktivita ethanolického extraktu (80%) z planě rostoucí rostliny <i>Momordica charantia</i> (MCH)	62
Tabulka 15 Protizánětlivá aktivita ethanolického extraktu (80%) z planě rostoucí rostliny <i>Momordica charantia</i> (MCH)	65
Tabulka 16 Antikarcinogenní aktivita a cytotoxicita extraktu <i>M. charantia</i>	66
Tabulka 17 Výtěžnost extraktů <i>S. stramonifolium</i> po lyofilizaci	69
Tabulka 18 Kvalitativní a kvantitativní stanovení fenolických látek v extraktu z listů rostliny <i>Solanum stramonifolium</i>	71
Tabulka 19 Kvalitativní a kvantitativní stanovení fenolických látek v extraktu z kořene a stonku rostliny <i>Solanum stramonifolium</i>	77
Tabulka 20 Antibakteriální aktivita hrubých extraktů <i>Solanum stramonifolium</i>	80
Tabulka 21 Antioxidační aktivita extraktů (80% ethanol) z různých částí rostliny <i>Solanum stramonifolium</i>	81
Tabulka 22 Protizánětlivá aktivita extraktů (80% ethanol) z různých částí rostliny <i>Solanum stramonifolium</i>	83
Tabulka 23 Antikarcinogenní a cytotoxická aktivita extraktů <i>S. stramonifolium</i>	84

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CAROCHO, Marcio, Maria Filomena BARREIRO, Patricia MORALES a Isabel C F R FERREIRA. Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2014, **13**(4), 377–399. Dostupné z: doi:10.1111/1541-4337.12065
- [2] KALEMBA, D a A KUNICKA. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 2003, **10**, 813–829.
- [3] VIEIRA DA SILVA, Beatriz, J. C. M. BARREIRA a M. B. P. P. OLIVEIRA. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. *Trends in Food Science and Technology*. 2016, **50**, 144–158.
- [4] CAROCHO, Marcio a Isabel C F R FERREIRA. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2013, **51**, 15–25. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2012.09.021
- [5] KVASNIČKOVÁ, Alexandra. *ILSI Europe: Funkční potraviny* [online]. 2009 [vid. 2017-05-16]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/funkcni-potraviny-a-legislativa.aspx>
- [6] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 ze dne 25. listopadu 2015 o nových potravinách, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 a o zrušení nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 258/97 a nařízení Komise (ES) č. *Úřední věstník Evropské unie* [online]. [vid. 2020-11-02]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32015R2283>
- [7] Prováděcí nařízení Komise (EU) 2017/2470 ze dne 20. prosince 2017, kterým se zřizuje seznam Unie pro nové potraviny v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 o nových potravinách. *Úřední věstník Evropské unie* [online]. 2017 [vid. 2020-10-01]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX%3A32017R2470>
- [8] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 ze dne 20. prosince 2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin. *Úřední věstník Evropské unie* [online]. 2007 [vid. 2020-10-01]. Dostupné z: <https://esipa.cz/sbirka/sbsrv.dll/sb?DR=SB&CP=32006R1924>
- [9] ČESKO. Vyhláška č. 58/2018 Sb. o doplňcích stravy a složení potravin. *Zákon č. 110/1997 Sbírky zákonů ČR* [online]. 2018 [vid. 2020-11-10]. Dostupné z: <https://www.psp.cz/sqw/sbirka.sqw?cz=58&r=2018>
- [10] GRAND VIEW RESEARCH. *Functional Foods Market Analysis By Product (Carotenoids, Dietary Fibers, Fatty Acids, Minerals, Prebiotics & Probiotics, Vitamins), By Application, By End-Use (Sports Nutrition, Weight Management, Immunity, Digestive Health) And Segment Forecasts, 2014 T* [online]. 2016. Dostupné z: doi:GVR-1-68038-195-5
- [11] MORA, Camilo, Derek P TITTENSOR, Sina ADL, Alastair G B SIMPSON a Boris WORM. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biology* [online]. 2011, **9**(8), e1001127. ISSN 1544-9173. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.1001127
- [12] PIETERS, Luc a Arnold J. VLIETINCK. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2005, **100**(1), 57–60 [vid. 2017-04-27]. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2005.05.029

- [13] PANDEY, Saurabh, Paul N SHAW a Amitha K HEWAVITHARANA. Review of Procedures Used for the Extraction of Anti-Cancer Compounds from Tropical Plants. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2015, **15**(3), 314–326.
- [14] TROPICOS DATABASE. *Momordica charantia*. *Missouri Botanical Garden* [online]. 2020 [vid. 2020-02-02]. Dostupné z: <http://legacy.tropicos.org/Name/9200010>
- [15] DAS, H B, K MAJUMDAR, B K DATTA a D RAY. Ethnobotanical uses of some plants by Tripuri and Reang tribes of Tripura. *Natural Product Radiance*. 2009, **8**(2), 172–180.
- [16] KUBOLA, Jittawan a Sirithon SIRIAMORNPNUN. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chemistry* [online]. 2008, **110**(4), 881–890. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.076
- [17] DANDAWATE, Prasad R, Dharmalingam SUBRAMANIAM, Subhash B PADHYE a Shrikant ANANT. Bitter melon: a panacea for inflammation and cancer. *Chinese Journal of Natural Medicines* [online]. 2016, **14**(2), 81–100. Dostupné z: doi:10.1016/s1875-5364(16)60002-x
- [18] HABICHT, Sandra D, Christine LUDWIG, Ray Yu YANG a Michael B KRAWINKEL. *Momordica charantia* and type 2 diabetes: from in vitro to human studies. *Current diabetes reviews*. 2014, **10**(1), 48–60.
- [19] TAN, Sing P, Tuyen C KHA, Sophie E PARKS a Paul D ROACH. Bitter melon (*Momordica charantia* L.) bioactive composition and health benefits: A review. *Food Reviews International* [online]. 2016, **32**(2), 181–202. Dostupné z: doi:10.1080/87559129.2015.1057843
- [20] UPADHYAY, Aparna, Pooja AGRAHARI a D K SINGH. A Review on Salient Pharmacological Features of *Momordica charantia*. *International Journal of Pharmacology* [online]. 2015, **11**(5), 405–413. Dostupné z: doi:10.3923/ijp.2015.405.413
- [21] GROVER, J K a S P YADAV. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2004, **93**(1), 123–132. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2004.03.035
- [22] FANG, E F a T B NG. Bitter Gourd (*Momordica charantia*) is a Cornucopia of Health: A Review of its Credited Antidiabetic, Anti-HIV, and Antitumor Properties. *Current Molecular Medicine*. 2011, **11**(5), 417–436.
- [23] LEELAPRAKASH, G, J Caroline ROSE, B M GOWTHAM, Pradeep Krishna JAVVAJI a S A PRASAD. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of *Momordica charantia* leaves. *Pharmacophore*. 2011, **2**(4), 244–252.
- [24] CHANG, Chi- I, Chang-Hung CHOU, Ming-Huei LIAO, Tz-Min CHEN, Chia-Hsin CHENG, Rista ANGGRIANI, Chung-Pao TSAI, Hsin- I TSENG a Hsueh-Ling CHENG. Bitter melon triterpenes work as insulin sensitizers and insulin substitutes in insulin-resistant cells. *Journal of Functional Foods* [online]. 2015, **13**, 214–224. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2014.12.050
- [25] TUMKIRATIWONG, Panas, Ravicha PLOYATTARAPINYO, Urai PONGCHAIRERK a Wachiryah THONG-ASA. Reproductive toxicity of *Momordica charantia* ethanol seed extracts in male rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* [online]. 2014, **12**(10), 695–704. ISSN 1680-6433. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4248156/>
- [26] WHALEN, M D, D E COSTICH a C B HEISER. Taxonomy of *Solanum* section *Lasiocarpa*. *Gentes Herbarum*. 1981, **12**, 41–129.

- [27] DEFILIPPS, R A, S L MAINA, J CREPIN a National Museum of Natural History Department of BOTANY. *Medicinal Plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana)* [online]. B.m.: Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, 2004. Dostupné z: <https://books.google.pt/books?id=GNZYGwAACAAJ>
- [28] PEDROLLO, Camilo Tomazini, Valdely Ferreira KINUPP, Glenn SHEPARD JR a Michael HEINRICH. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2016, **186**, 111–124. Dostupné z: [doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.055](http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.055)
- [29] SAMEE, Weerasak, Mongkol ENKALOHAKUL, Nakharin NEBBUA, Paradorn DIREKROJANAVUTI, Chayanid SORNCHAITHWATWONG a Narisa KAMKAEN. Correlation Analysis between Total Acid, Total Phenolic and Ascorbic Acid Contents in Fruit Extracts and Their Antioxidant Activities [online]. 2006, **1**(3), 196–203. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.590.1123&rep=rep1&type=pdf>
- [30] WETWITAYAKLUNG, P a T PHAECHAMUD. Antioxidant activities and phenolic content of solamun and capsicum sp. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* [online]. 2011, **2**(2), 146–154. Dostupné z: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-79955527262&partnerID=40&md5=d92db0b0ec841de97ef04b08ae86df39>
- [31] SAKUNPAK, A a P PANICHAYUPAKARANANT. Antibacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone. *Food Chemistry* [online]. 2012, **130**(4), 826–831. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.088](http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.088)
- [32] PARR, A J, F A MELLON, I J COLQUHOUN a H V DAVIES. Dihydrocaffeoyl polyamines (kukoamine and allies) in potato (*Solanum tuberosum*) tubers detected during metabolite profiling. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2005, **53**(13), 5461–5466. Dostupné z: [doi:10.1021/jf050298i](http://dx.doi.org/10.1021/jf050298i)
- [33] AUSTIN, Daniel F a Godfrey R BOURNE. Notes on Guyana's Medical Ethnobotany. *Economic Botany* [online]. 1992, **46**(3), 293–298. ISSN 00130001, 18749364. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/4255444>
- [34] SARNTHIMA, Rakrudee a Saranyu KHAMMUANG. Antibacterial Activities of *Solanum stramonifolium* Seed Extract. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2012, **14**(1), 111–115.
- [35] PINGAL, Ramish. *Phytochemical studies on Solanum arboreum, Solanum asperum, Solanum stramonifolium and Solanum triste* [online]. St. Augustine, Trinidad and Tobago, 2008. University of West Indies. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/2139/2484>
- [36] CHANMEE, Watinee, Chanya CHAICHAROENPONG a Amorn PETSOM. Lipase Inhibitor from Fruits of *Solanum stramonifolium* Jacq. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* [online]. 2013, **2**(2), 146–154. Dostupné z: http://www.rjpbcs.com/pdf/2011_2%282%29/18.pdf
- [37] AIRES, Isabel C S, Renato A LIMA a Andrina G S BRAGA. Identificação de Metabólitos Secundários no Extrato Etanólico das Raízes de *Solanum stramonifolium* (Solanaceae). In: *64^o Congresso Nacional de Botânica* [online]. 2013. Dostupné z: <http://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/64CNBot/resumo-ins20025-id6164.pdf>
- [38] PANDEY, Kanti Bhooshan a Syed Ibrahim RIZVI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2009, **2**(5), 270–278. ISSN 1942-0900.

- [39] SOLOVCHENKO, Alexei a Michaela SCHMITZ-EIBERGER. Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. *Journal of experimental botany*. 2003, **54**(389), 1977–1984. ISSN 1460-2431.
- [40] VERMERRIS, Wilfred a Ralph NICHOLSON. *Phenolic compound biochemistry*. B.m.: Springer Science & Business Media, 2007. ISBN 1402051646.
- [41] SCALBERT, Augustin a Gary WILLIAMSON. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*. 2000, **130**(8), 2073S–2085S. ISSN 0022-3166.
- [42] SLANINA, J a E TABORSKA. Intake, Bioavailability, and Metabolisms of Plant Polyphenols in Humans. *Chemické listy*. 2004, **98**(5). ISSN 1213-7103.
- [43] SOTO, María, Elena FALQUÉ a Herminia DOMÍNGUEZ. Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. *Cosmetics* [online]. 2015, **2**, 259–276. Dostupné z: doi:10.3390/cosmetics2030259
- [44] NOVÁKOVÁ, Lucie, Zdeněk SPÁČIL, Marcela SEIFRTOVÁ, Lubomír OPLETAL a Petr SOLICH. Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures. *Talanta*. 2010, **80**(5), 1970–1979. ISSN 0039-9140.
- [45] RAHMAN, Md Jiaur, Adriano Costa DE CAMARGO a Fereidoon SHAHIDI. Phenolic profiles and antioxidant activity of defatted camelina and sophia seeds. *Food chemistry*. 2018, **240**, 917–925. ISSN 0308-8146.
- [46] ZAIN, Muhammad Zuhair Mohd, Ahmad Salihin BABA a Amal Bakr SHORI. Effect of polyphenols enriched from green coffee bean on antioxidant activity and sensory evaluation of bread. *Journal of King Saud University-Science*. 2018, **30**(2), 278–282. ISSN 1018-3647.
- [47] CLIFFORD, Michael N, Indu B JAGANATH, Iziar A LUDWIG a Alan CROZIER. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: Discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Natural Product Reports*. 2017, **34**(12), 1391–1421.
- [48] HÄSSIG, A, W X LINAG, H SCHWABL a K STAMPFLI. Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Medical hypotheses*. 1999, **52**(5), 479–481. ISSN 0306-9877.
- [49] HERTOOG, Michael G L, Peter C H HOLLMAN a Martijn B KATAN. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1992, **40**(12), 2379–2383. ISSN 0021-8561.
- [50] VAN ACKER, Frédérique A A, Janneke W HULSHOF, Guido R M M HAENEN, Wiro M P B MENGE, Wim J F VAN DER VIJGH a Aalt BAST. New synthetic flavonoids as potent protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001, **31**(1), 31–37. ISSN 0891-5849.
- [51] HOLIMAN, Peter C H, Michaël G L HERTOOG a Martijn B KATAN. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*. 1996, **57**(1), 43–46. ISSN 0308-8146.
- [52] RHODES, Martin J a K R PRICE. Identification and analysis of plant phenolic antioxidants. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*. 1997, **6**(6), 518–521. ISSN 0959-8278.
- [53] AGATI, Giovanni, Paolo MATTEINI, Andrea GOTI a Massimiliano TATTINI. Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytologist*. 2007, **174**(1), 77–89.

ISSN 0028-646X.

- [54] ELEJALDE-PALMETT, Carolina, Thomas Dugé DE BERNONVILLE, Gaëlle GLEVAREC, Olivier PICHON, Nicolas PAPON, Vincent COURDAVAULT, Benoit ST-PIERRE, Nathalie GIGLIOLI-GUIVARC'H, Arnaud LANOUE a Sébastien BESSEAU. Characterization of a spermidine hydroxycinnamoyltransferase in *Malus domestica* highlights the evolutionary conservation of trihydroxycinnamoyl spermidines in pollen coat of core Eudicotyledons. *Journal of experimental botany*. 2015, **66**(22), 7271–7285. ISSN 0022-0957.
- [55] ZACARÉS, Laura, María Pilar LÓPEZ-GRESA, Joaquín FAYOS, Jaime PRIMO, José María BELLÉS a Vicente CONEJERO. Induction of p-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2007, **20**(11), 1439–1448. ISSN 0894-0282.
- [56] HUANG, Wenlin, Olga SERRA, Keyvan DASTMALCHI, Liqing JIN, Lijia YANG a Ruth E STARK. Comprehensive MS and solid-state NMR metabolomic profiling reveals molecular variations in native periderms from four *Solanum tuberosum* potato cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2017, **65**(10), 2258–2274. ISSN 0021-8561.
- [57] JAIRATH, Gauri, Pradeep Kumar SINGH, Randhir Singh DABUR, Monika RANI a Mahavir CHAUDHARI. Biogenic amines in meat and meat products and its public health significance: a review. *Journal of Food Science and Technology*. 2015, **52**(11), 6835–6846. ISSN 0022-1155.
- [58] MATSUMOTO, Mitsuharu a Yoshimi BENNO. The relationship between microbiota and polyamine concentration in the human intestine: a pilot study. *Microbiology and immunology*. 2007, **51**(1), 25–35. ISSN 0385-5600.
- [59] KALÁČ, Pavel. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. *Food Chemistry*. 2014, **161**, 27–39. ISSN 0308-8146.
- [60] ELOFF, J N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 1998, **60**(1), 1–8. ISSN 0378-8741. Dostupné z: doi:[http://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00123-2](http://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00123-2)
- [61] CHEMAT, Farid, Maryline Abert VIAN a Giancarlo CRAVOTTO. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, **13**(7), 8615–8627. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms13078615
- [62] CHEW, K K, M Z KHOO, S Y NG, Y Y THOO, W M WAN AIDA a C W HO. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*. 2011, **18**(4). ISSN 1985-4668.
- [63] TSAKONA, Sofia, Charis M GALANAKIS a Vassilis GEKAS. Hydro-ethanolic mixtures for the recovery of phenols from Mediterranean plant materials. *Food and Bioprocess Technology*. 2012, **5**(4), 1384–1393. ISSN 1935-5130.
- [64] MCDONALD, Suzy, Paul D PRENZLER, Michael ANTOLOVICH a Kevin ROBARDS. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food chemistry*. 2001, **73**(1), 73–84. ISSN 0308-8146.
- [65] SULTANA, Bushra, Farooq ANWAR a Muhammad ASHRAF. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules* [online]. 2009, **14**(6), 2167–2180. Dostupné z: doi:10.3390/molecules14062167
- [66] OROIAN, Mircea a Isabel ESCRICHE. Antioxidants: characterization, natural sources,

- extraction and analysis. *Food Research International*. 2015, **74**, 10–36. ISSN 0963-9969.
- [67] GU, Ronghui, Yuehu WANG, Bo LONG, Edward KENNELLY, Shibiao WU, Bo LIU, Ping LI a Chunlin LONG. Prospecting for Bioactive Constituents from Traditional Medicinal Plants through Ethnobotanical Approaches. *Biol Pharm Bull*. 2014, **37**(6), 903–915.
- [68] ZEUTHEN, Peter a Leif BØGH-SØRENSEN. *Food preservation techniques*. B.m.: Elsevier, 2003. ISBN 1855737140.
- [69] RIOS, J L a M C RECIO. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2005, **100**(1–2), 80–84. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2005.04.025
- [70] SILVA, N C C a A FERNANDES JÚNIOR. *Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity*. B.m.: scielo. 2010. ISBN 1678-9199 UL - http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992010000300006&nrm=iso
- [71] ZALÁN, Zs. Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality. *Acta Alimentaria* [online]. 2015, **44**(2), 316–319. ISSN 0139-3006. Dostupné z: doi:10.1556/066.2015.44.0009
- [72] PINELA, José a Isabel C F R FERREIRA. Non-thermal physical technologies to decontaminate and extend the shelf-life of fruits and vegetables: trends aiming at quality and safety. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2015, (just-accepted), 0. ISSN 1040-8398.
- [73] KYZLINK, V. *Teoretické základy konzervace potravin*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1988. ISBN 04-812-88.
- [74] INGR, Ivo. *Základy konzervace potravin*. 3. vyd. B.m.: Mendelova Univerzita v Brně, 2007. ISBN 978-80-7375-110-4.
- [75] ŠTÍPEK, Stanislav. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-7169-704-4.
- [76] PISOSCHI, Aurelia Magdalena a Aneta POP. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2015, **97**, 55–74. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040
- [77] PRIOR, R L, X L WU a K SCHAICH. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2005, **53**(10), 4290–4302. Dostupné z: doi:10.1021/jf0502698
- [78] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chem. Listy* [online]. 2004, **98**(179) [vid. 2017-04-24]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf
- [79] NENADIS, N a M Z TSIMIDOU. Assessing the activity of natural food antioxidants. In: DJ DECKER, EA AND ELIAS, RJ AND MCCLEMENTS, ed. *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications, vol. 1: Understanding mechanisms of oxidation and antioxidant activity*. Abington, Cambridge, UK: Woodhead Publishing, Ltd., 2011, Woodhead Publishing in Food Science Technology and Nutrition, s. 332–367. ISBN 978-1-84569-983-3.
- [80] LIANG, Ningjian a David D KITTS. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients* [online]. 2016, **8**(1). Dostupné z: doi:10.3390/nu8010016
- [81] BERKER, Kadriye İl, Kubilay GÜÇLÜ, İzzet TOR a Reat APAK. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline,

- batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta* [online]. 2007, **72**, 1157–1165 [vid. 2017-04-24]. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2007.01.019
- [82] KAUR, Indu P a Thiraviam GEETHA. Screening methods for antioxidants-a review. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2006, **6**(3), 305–312. ISSN 1389-5575.
- [83] MOON, Joon-Kwan a Takayuki SHIBAMOTO. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009, **57**(5), 1655–1666. ISSN 0021-8561.
- [84] JOO, Taewoo, Kandhasamy SOWNDHARARAJAN, Sunghyun HONG, Jaehak LEE, Sun-Young PARK, Songmun KIM a Jin-Woo JHOO. Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila* L. *Saudi Journal of Biological Sciences* [online]. 2014, **21**(5), 427–435. ISSN 1319-562X. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.04.003
- [85] SERAFINI, M, I PELUSO a A RAGUZZINI. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society* [online]. 2010, **69**(3), 273–278. Dostupné z: doi:10.1017/S002966511000162X
- [86] CONFORTI, F a F MENICHINI. Phenolic compounds from plants as nitric oxide production inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2011, **18**(8), 1137–1145. Dostupné z: doi:10.2174/092986711795029690
- [87] BOGDAN, C, M RÖLLINGHOFF a A DIEFENBACH. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological Reviews* [online]. 2000, **173**, 17–26. Dostupné z: doi:10.1034/j.1600-065X.2000.917307.x
- [88] PACHER, P, J S BECKMAN a L LIAUDET. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews* [online]. 2007, **87**(1), 315–424. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00029.2006
- [89] NICHOLAS, C, S BATRA, M A VARGO, O H VOSS, M A GAVRILIN, M D WEWERS, D C GUTTRIDGE, E GROTEWOLD a A I DOSEFF. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF- κ B through the suppression of p65 phosphorylation. *Journal of Immunology* [online]. 2007, **179**(10), 7121–7127. Dostupné z: https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-38449107785&partnerID=40&md5=4b2eb147ad91c5450ee711c98adfded1
- [90] IVANOV, V M. The 125th Anniversary of the Griess Reagent. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2004, **59**(10), 1002–1005. ISSN 1608-3199. Dostupné z: doi:10.1023/B:JANC.0000043920.77446.d7
- [91] EUROSTAT. *Statistika příčin smrti* [online]. 2016 [vid. 2017-01-05]. Dostupné z: ww.ec.europa.eu
- [92] ÚZIS, ČR. *Nová data: celková zátěž zhoubnými novotvary v ČR, Zemřelí, 2015* [online]. 2015. Dostupné z: WWW.svod.cz/publikace/60.pdf
- [93] VICHAI, Vanicha a Kanyawim KIRTIKARA. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protocols* [online]. 2006, **1**(3), 1112–1116. ISSN 1754-2189. Dostupné z: http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.179
- [94] STACEY, Glyn, Alan DOYLE a Margherita FERRO. *Cell Culture Methods for In Vitro Toxicology* [online]. 1. vyd. B.m.: Springer Neatherlands, 2001. ISBN 978-94-017-0996-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-017-0996-5

- [95] DOUŠA, M. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. Učební tex. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav, 2002. ISBN 80-86548-09-0.
- [96] HOLČAPEK, M. Hmotnostní spektrometrie. *Experimentální metody strukturálního výzkumu* [online]. 2017 [vid. 2017-01-05]. Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz>
- [97] CHANDOURA, Hassiba, Joao C M BARREIRA, Lillian BARROS, Celestino SANTOS-BUELGA, Isabel C F R FERREIRA a Lotfi ACHOUR. Seeds of *Opuntia* spp. as a novel high potential by-product: Phytochemical characterization and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products* [online]. 2015, **65**, 383–389. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2014.11.011
- [98] EUCAST. *ESCMID: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* [online]. 2013 [vid. 2016-03-03]. Dostupné z: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents/
- [99] KLOUCEK, P, Z POLESNY, B SVOBODOVA, E VLKOVA a L KOKOSKA. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2005, **99**(2), 309–312. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2005.01.062
- [100] CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 18th informational supplement. CLSI document M100-S18*. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- [101] SVOBODOVA, Blanka, Lillian BARROS, Ricardo C CALHELHA, Sandrina HELENO, Maria Jose ALVES, Simone WALCOTT, Miroslava BITTOVA, Vlastimil KUBAN a Isabel C F R FERREIRA. Bioactive properties and phenolic profile of *Momordica charantia* L. medicinal plant growing wild in Trinidad and Tobago. *Industrial Crops and Products*. 2017, **95**, 365–373. ISSN 0926-6690.
- [102] KUETE, Victor, Patrick Y ANGO, Ghislain W FOTSO, Gilbert D W F KAPCHE, Jean P DZOYEM, Arlette G WOUKING, Bonaventure T NGADJUI a Berhanu M ABEGAZ. Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from *Artocarpus communis* (Moraceae). *BMC complementary and alternative medicine* [online]. 2011, **11**. Dostupné z: doi:10.1186/1472-6882-11-42
- [103] PEREIRA, Carla, Ricardo C CALHELHA, Lillian BARROS a Isabel C F R FERREIRA. Antioxidant properties, anti-hepatocellular carcinoma activity and hepatotoxicity of artichoke, milk thistle and borututu. *Industrial Crops and Products*. 2013, **49**, 61–65. ISSN 0926-6690.
- [104] CORREA, Rubia Carvalho Gomes, Aloisio HENRIQUE PEREIRA DE SOUZA, Ricardo C CALHELHA, Lillian BARROS, Jasmina GLAMOCLIIJA, Marina SOKOVIC, Rosane Marina PERALTA, Adelar BRACHT a Isabel C F R FERREIRA. Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. *Food & Function* [online]. 2015, **6**(7), 2155–2164. Dostupné z: doi:10.1039/c5fo00465a
- [105] BARROS, Lillian, Eliana PEREIRE, Ricardo C CALHELHA, Montserrat DUENAS, Ana Maria CARVALHO, Celestino SANTOS-BUELGA a Isabel C F R FERREIRA. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods* [online]. 2013, **5**(4), 1732–1740. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2013.07.019
- [106] BARROS, Lillian, Montserrat DUENAS, Maria Ines DIAS, Maria Joao SOUSA, Celestino SANTOS-BUELGA a Isabel C F R FERREIRA. Phenolic profiles of in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry* [online]. 2012, **132**(2), 841–848. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.048

- [107] LESTARI, Putri, Kotnik KATRIN, Rissyelly RISSYELLY a Putu MAHAYASIH. Inhibition Activity of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) and Determination of Total Phenolic and Flavonoid Compound from Bitter Melon Leaves (*Momordica charantia* L.). *Pharmacognosy Journal* [online]. 2017, **9**, 252–256. Dostupné z: doi:10.5530/pj.2017.2.43
- [108] AMIRA, K, A AMINAH a A ZUHAIK. Evaluation of bitter melon (*Momordica charantia*) extract administration in the antioxidant and free radical scavenging activities of plasma and liver in male rat. *International Food Research Journal*. 2013, **20**(1). ISSN 1985-4668.
- [109] CLIFFORD, M N, K L JOHNSTON, S KNIGHT a N KUHNERT. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2003, **51**(10), 2900–2911. Dostupné z: doi:10.1021/jf026187q
- [110] CLIFFORD, M N, S KNIGHT a N KUHNERT. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2005, **53**(10), 3821–3832. Dostupné z: doi:10.1021/jf050046h
- [111] MADALA, N E, F TUGIZIMANA a P A STEENKAMP. Development and Optimization of an UPLC-QTOF-MS/MS Method Based on an In-Source Collision Induced Dissociation Approach for Comprehensive Discrimination of Chlorogenic Acids Isomers from *Momordica* Plant Species. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* [online]. 2014. Dostupné z: doi:10.1155/2014/650879
- [112] MADALA, Ntakadzeni Edwin, Lizelle PIATER, Ian DUBERY a Paul STEENKAMP. Distribution patterns of flavonoids from three *Momordica* species by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry: a metabolomic profiling approach. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. 2016, **in press**. Dostupné z: doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.009
- [113] ZHANG, Min, Navam S HETTIARACHCHY, Ronny HORAX, Pengyin CHEN a Kenneth F OVER. Effect of Maturity Stages and Drying Methods on the Retention of Selected Nutrients and Phytochemicals in Bitter Melon (*Momordica charantia*) Leaf. *Journal of food science* [online]. 2009, **74**(6), C441–C448. Dostupné z: doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01222.x
- [114] KENNY, O, T J SMYTH, C M HEWAGE a N P BRUNTON. Antioxidant properties and quantitative UPLC-MS analysis of phenolic compounds from extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and bitter melon (*Momordica charantia*) fruit. *Food Chemistry* [online]. 2013, **141**(4), 4295–4302. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.016
- [115] LAKO, J, V C TRENERRY, M WAHLQVIST, N WATTANAPENPAIBOON, S SOTHEESWARAN a R PREMIER. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry* [online]. 2007, **101**(4), 1727–1741. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2006.01.031
- [116] CHOI, Jine Shang, Hyun Young KIM, Weon Taek SEO, Jin Hwan LEE a Kye Man CHO. Roasting Enhances Antioxidant Effect of Bitter Melon (*Momordica charantia* L.) Increasing in Flavan-3-ol and Phenolic Acid Contents. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2012, **21**(1), 19–26. Dostupné z: doi:10.1007/s10068-012-0003-7
- [117] NORMANNO, G, G LA SALANDRA, A DAMBROSIO, N C QUAGLIA, M CORRENTE, A PARISI, G SANTAGADA, A FIRINU, E CRISSETTI a G V CELANO. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2007, **115**(3), 290–296. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.049
- [118] KAPOOR, Garima, Saurabh SAIGAL a Ashok ELONGAVAN. Action and resistance

- mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*. 2017, **33**(3), 300.
- [119] BRACA, Alessandra, Tiziana SICILIANO, Manuela D'ARRIGO a Maria Paola GENNANO. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. *Fitoterapia* [online]. 2008, **79**(2), 123–125. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2007.11.002
- [120] MADA, S B, A GARBA, H A MOHAMMED, A MUHAMMAD, A OLAGUNJU a A B MUHAMMAD. Antimicrobial activity and phytochemical screening of aqueous and ethanol extracts of *Momordica charantia* L. leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2013, **7**(10), 579–586.
- [121] OLUFUNKE, Oluduro Anthonia. Antibacterial Activities of *Allium sativum*, *Momordica charantia* and *Zingiber officinale* on Food-and Water-Borne Pathogens. *African Journal of Plant Science and Biotechnology*. 2011, **5**(1), 15–19.
- [122] MWAMBETE, K D. The in vitro antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Momordica charantia*: A Tanzania medicinal plant. *African health sciences*. 2009, **9**(1), 34–39.
- [123] RAKHOLIYA, Kalpna, P VAGHELA, T RATHOD a Sumitra CHANDA. Comparative study of hydroalcoholic extracts of *Momordica charantia* L. against foodborne pathogens. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 2014, **76**(2), 148.
- [124] MAHOMOODALLY, M F, A GURIB-FAKIM a A H SUBRATTY. Screening for alternative antibiotics: an investigation into the antimicrobial activities of medicinal food plants of Mauritius. *Journal of food science*. 2010, **75**(3), M173–M177.
- [125] COSTA, Jose Galberto M, Eidla M M NASCIMENTO, Adriana R CAMPOS a Fabiola F G RODRIGUES. Antibacterial activity of *Momordica charantia* (Curcubitaceae) extracts and fractions. *Journal of basic and clinical pharmacy*. 2010, **2**(1), 45–51.
- [126] PHATTHALUNG, Pinanong Na, Sasitorn CHUSRI a Supayang P VORAVUTHIKUNCHAI. Thai ethnomedicinal plants as resistant modifying agents for combating *Acinetobacter baumannii* infections. *BMC complementary and alternative medicine*. 2012, **12**(1), 1.
- [127] LU, YehLin, YuhHwa LIU, WenLi LIANG, JongHo CHUANG, KurTa CHENG, HongJen LIANG a WenChi HOU. Antibacterial and cytotoxic activities of different wild bitter gourd cultivars (*Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Seringe). *Botanical Studies*. 2011, **52**(4), 427–434.
- [128] JAGESSAR, R C, A MOHAMED a G GOMES. An evaluation of the Antibacterial and Antifungal activity of leaf extracts of *Momordica Charantia* against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nature and Science*. 2008, **6**(1), 1–14.
- [129] HODEK, P. Flavonoids. In: *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics* [online]. 2012, s. 543–582. Dostupné z: doi:10.1002/9783527630905.ch20
- [130] PULIDO, R, L BRAVO a F SAURA-CALIXTO. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2000, **48**(8), 3396–3402. Dostupné z: doi:10.1021/jf9913458
- [131] VON GADOW, A, E JOUBERT, C F HANSMANN, A VONGADOW, E JOUBERT a C F HANSMANN. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), alpha-tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 1997, **45**(3), 632–638. Dostupné z: doi:10.1021/jf960281n

- [132] YANG, Chunyan, Fu LI, Xiaolong ZHANG, Lun WANG, Zhiqiong ZHOU a Mingkui WANG. Phenolic antioxidants from *Rosa soulieana* flowers. *Natural Product Research* [online]. 2013, **27**(21), 2055–2058. Dostupné z: doi:10.1080/14786419.2013.811660
- [133] WU, ShuJing a LeanTeik NG. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *Lwt-Food Science and Technology* [online]. 2008, **41**(2), 323–330. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2007.03.003
- [134] LU, YehLin, YuhHwa LIU, JongHo CHYUAN, KurTa CHENG, WenLi LIANG a WenChi HOU. Antioxidant activities of different wild bitter gourd (*Momordica charantia* L. var. *abbreviata* Seringe) cultivars. *Botanical Studies*. 2012, **53**(2), 207–214.
- [135] NAGARANI, Gunasekaran, Arumugam ABIRAMI a Perumal SIDDHURAJU. A comparative study on antioxidant potentials, inhibitory activities against key enzymes related to metabolic syndrome, and anti-inflammatory activity of leaf extract from different *Momordica* species. *Food Science and Human Wellness* [online]. 2014, **3**(1), 36–46. Dostupné z: doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2014.02.003
- [136] CHEN, YenChou, ShingChuan SHEN, WoanRuoh LEE, WenChi HOU, LingLing YANG a Tony J F LEE. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *Journal of cellular biochemistry*. 2001, **82**(4), 537–548.
- [137] HSU, Chin, TsungHsien TSAI, YouYi LI, WenHuey WU, ChingJang HUANG a PoJung TSAI. Wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) extract and its bioactive components suppress *Propionibacterium acnes*-induced inflammation. *Food Chemistry* [online]. 2012, **135**(3), 976–984. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.045
- [138] TSAI, Tzung-Hsun, Wen-Cheng HUANG, How-Ting YING, Yueh-Hsiung KUO, Chien-Chang SHEN, Yin-Ku LIN a Po-Jung TSAI. Wild Bitter Melon Leaf Extract Inhibits *Porphyromonas gingivalis*-Induced Inflammation: Identification of Active Compounds through Bioassay-Guided Isolation. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. 2016, **21**(4). Dostupné z: doi:10.3390/molecules21040454
- [139] GANESAN, A, S NATESAN, P G PERUMAL, R VELLAYUTHAM, K MANICKAM a N RAMASAMY. Anxiolytic, antidepressant and anti-inflammatory activities of methanol extract of *Momordica charantia* Linn leaves (Cucurbitaceae). *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* [online]. 2008, **7**(1), 43–47. Dostupné z: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-67649643491&partnerID=40&md5=84707db1703ba44f1e652f6ecc71bca3>
- [140] LII, ChongKuei, HawWen CHEN, WenTzu YUN a KaiLi LIU. Suppressive effects of wild bitter gourd (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* ser.) fruit extracts on inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2009, **122**(2), 227–233. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2009.01.028
- [141] LEE, S J, S Y LEE, H J HA, S H CHA, S K LEE a S J HUR. Rutin attenuates lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophage cells. *Journal of Food and Nutrition Research* [online]. 2015, **3**(3), 202–205. Dostupné z: doi:10.12691/jfnr-3-3-12
- [142] SOBERON, Jose R, Melina A SGARIGLIA, Diego A SAMPIETRO, Emma N QUIROGA a Marta A VATTUONE. Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodanthus acutifolius*. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2010, **130**(2), 329–333. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2010.05.015
- [143] ROGERIO, A P, A KANASHIRO, C FONTANARI, E V G DA SILVA, Y M LUCISANO-

- VALIM, E G SOARES a L H FACCIOLI. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation Research* [online]. 2007, **56**(10), 402–408. Dostupné z: doi:10.1007/s00011-007-7005-6
- [144] LEE, HyangBok, EunKi KIM, SangJae PARK, Sang Gu BANG, Tae Gil KIM a Dae Won CHUNG. Isolation and anti-inflammatory effect of astragalins synthesized by enzymatic hydrolysis of tea seed extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2011, **91**(13), 2315–2321. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.4457
- [145] BAI, LiYuan, ChangFang CHIU, PoChen CHU, WeiYu LIN, ShihJiuan CHIU a JingRu WENG. A triterpenoid from wild bitter melon inhibits breast cancer cells. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**. Dostupné z: doi:10.1038/srep22419
- [146] RAZAVI, Seyed Mehdi, Saber ZAHRI, Gholamreza ZARRINI, Hossein NAZEMIYEH a Sariyeh MOHAMMADI. Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* [online]. 2009, **35**(3), 376–378. Dostupné z: doi:10.1134/s1068162009030133
- [147] HE, Xiangjiu a Rui Hai LIU. Phytochemicals of Apple Peels: Isolation, Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidant Activities. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2008, **56**(21), 9905–9910. Dostupné z: doi:10.1021/jf8015255
- [148] ROLEIRA, Fernanda M F, Elisario J TAVARES-DA-SILVA, Carla L VARELA, Saul C COSTA, Tiago SILVA, Jorge GARRIDO a Fernanda BORGES. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry* [online]. 2015, **183**, 235–258. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.039
- [149] BARROS, Lillian, Montserrat DUEÑAS, Ana Maria CARVALHO, Isabel C F R FERREIRA a Celestino SANTOS-BUELGA. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 2012, **50**(5), 1576–1582. ISSN 0278-6915.
- [150] CLIFFORD, Michael N, Jo KIRKPATRICK, Nikolai KUHNERT, Hajo ROOZENDAAL a Paula Rodrigues SALGADO. LC–MS n analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. *Food Chemistry*. 2008, **106**(1), 379–385. ISSN 0308-8146.
- [151] LIN, Long-Ze a James M HARNLY. Identification of the phenolic components of collard greens, kale, and Chinese broccoli. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009, **57**(16), 7401–7408. ISSN 0021-8561.
- [152] INBARAJ, B Stephen, H LU, T H KAO a B H CHEN. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC–DAD–ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010, **51**(3), 549–556. ISSN 0731-7085.
- [153] MOCO, Sofia, Raoul J BINO, Oscar VORST, Harrie A VERHOEVEN, Joost DE GROOT, Teris A VAN BEEK, Jacques VERVOORT a C H Ric DE VOS. A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant physiology*. 2006, **141**(4), 1205–1218. ISSN 0032-0889.
- [154] GANCEL, Anne-Laure, Pascaline ALTER, Claudie DHUIQUE-MAYER, Jenny RUALES a Fabrice VAILLANT. Identifying carotenoids and phenolic compounds in naranjilla (*Solanum quitoense* Lam. var. Puyo hybrid), an Andean fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008, **56**(24), 11890–11899. ISSN 0021-8561.
- [155] NARVÁEZ-CUENCA, Carlos-Eduardo, Jean-Paul VINCKEN a Harry GRUPPEN. Identification and quantification of (dihydro) hydroxycinnamic acids and their conjugates in potato by UHPLC–DAD–ESI-MSn. *Food chemistry*. 2012, **130**(3), 730–738. ISSN 0308-8146.

- [156] FORERO, Diana Paola, Chieko MASATANI, Yoshinori FUJIMOTO, Ericsson COY-BARRERA, Devin G PETERSON a Coralia OSORIO. Spermidine Derivatives in Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) Fruit: Sensory (Taste) versus Biofunctional (ACE-Inhibition) Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2016, **64**(26), 5375–5383. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.6b01631
- [157] MHLONGO, M I, L A PIATER, Paul A STEENKAMP, N E MADALA a I A DUBERY. Metabolomic fingerprinting of primed tobacco cells provide the first evidence for the biological origin of cis-chlorogenic acid. *Biotechnology letters*. 2015, **37**(1), 205–209. ISSN 0141-5492.
- [158] PENDLETON, J N, S P GORMAN a B F GILMORE. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* [online]. 2013, **11**(3), 297–308. Dostupné z: doi:10.1586/eri.13.12
- [159] ANDERSSON, Dan I a Diarmaid HUGHES. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2010, **8**(4), 260–271. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro2319
- [160] KRÖNER, Alexander, Nathalie MARNET, Didier ANDRIVON a Florence VAL. Nicotiflorin, rutin and chlorogenic acid: phenylpropanoids involved differently in quantitative resistance of potato tubers to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Plant physiology and biochemistry*. 2012, **57**, 23–31. ISSN 0981-9428.
- [161] AMES, B N, M K SHIGENAGA a T M HAGEN. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1993, **90**(17), 7915–7922. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.90.17.7915
- [162] ELISABETSKY, E a G C de SOUZA. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2004, **2**, 87–99.
- [163] AMIR, Mohd a Shikha KUMAR. Possible industrial applications of genus *Solanum* in twentyfirst century-A review. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2004, **63**(2), 116–124. ISSN 0975-1084.
- [164] KUO, Kou-Wha, Shu-Hui HSU, Yun-Ping LI, Wei-Ling LIN, Li-Feng LIU, Li-Ching CHANG, Chih-Chao LIN, Chun-Nan LIN a Hamm-Ming SHEU. Anticancer activity evaluation of the *Solanum* glycoalkaloid solamargine: Triggering apoptosis in human hepatoma cells. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2000, **60**(12), 1865–1873. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00506-2

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
ATCC	Americká referenční kolekce mikroorganismů
BAL	Biologicky aktivní látky
BCA	antioxidační test odbarvování β -karotenu
BHI	kultivační bujón Brain Heart Infusion
CCM	Česká referenční kolekce mikroorganismů
CCDM	Česká referenční kolekce mlékařských mikroorganismů
CFU	kolonie tvořící jednotka
CI	chemická ionizace
CQA	Kyselina caffeoylchinová (chlorogenová)
DART	přímá analýza v reálném čase
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
EI	elektronová ionizace
ESBL	širokospektré beta-laktamasy
ESI	ionizace elektrosprejem
ESKAPE	skupina multiresistentních patogenů s druhy <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a <i>Enterobacter</i>
EU	Evropská unie
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FRAP	stanovení redukční síly pomocí železitých iontů

G+	grampozitivní (bakterie)
G-	gramnegativní (bakterie)
HAT	přenos atomu vodíku
HeLa	lidské buňky karcinomu děložního čípku
HepG2	lidské buňky hepatocelulárního karcinomu
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IL-6	interleukin-6
INT	<i>p</i> -jodnitrotetrazoliová violet'
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LPS	lipopolysacharid
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MALT	kultivační bujón se sladovým extraktem
MCF-7	lidské buňky karcinomu prsu
MCH	<i>Momordica chaantia</i> L.
MCP-1	mononukleární chemoprotektant
MHB	kultivační bujón Mueller Hinton
MMP-9	matrixová metaloproteináza
MRS	kultivační bujón de Man, Rogosa, Sharpe
MRSA	methicilin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	methicilin sensitivní <i>Staphylococcus aureus</i>
NCI-H460	lidské buňky karcinomu plic
NO	oxid dusnatý
ORAC	schopnost absorpce kyslíkového radikálu
PGE2	prostaglandin E2
PLP2	jaaterní vepřová primární buněčná linie
PBS	pufrovaný fyziologický roztok

RAW 264.7	myší makrofágová linie
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SET	přenos elektronu
SS	<i>Solanum stramonifolium</i> Jacq.
TAA	celková antioxidační aktivita
TBARS	reaktivní složky thiobarbiturové kyseliny
TNF - a	tumor nekrotizující faktor
TPC	stanovení celkových fenolických látek
TSB	kultivační bujón trypton-sojový
UPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie

SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Příspěvky v recenzovaných periodických s impakt faktorem

SVOBODOVÁ, B., BARROS, L., ŠOPÍK, T., CALHELHA, R.C., HELENO, S., ALVES, M.J., WALCOTT, S., KUBÁŇ, V., FERREIRA, I.C.F.R.. Non-edible parts of *Solanum stramonifolium* Jacq. – a new potent source of bioactive extracts rich in phenolics compounds for functional foods. *Food and Function*. 2017, č. 8, s. 2013-2021.

SVOBODOVÁ, B., BARROS, L., CALHELHA, R.C., HELENO, S., ALVES, M.J., WALCOTT, S., BITTOVÁ, M., KUBÁŇ, V., FERREIRA, I.C.F.R.. Bioactive properties and phenolic profile of *Momordica charantia* L. medicinal plant growing wild in Trinidad and Tobago. *Industrial Crops and Products*. 2017, č. 95, s. 365-373.

TESAŘOVÁ, H., **SVOBODOVÁ, B.**, KOKOŠKA, L., MARŠÍK, P., PŘIBYLOVÁ, M., LANDA, P., VADLEJCH, J. Determination of oxygen radical absorbance capacity of black cumin (*Nigella sativa*) seed quinone compounds. *Natural Product Communications*. 2011, č. 2, s. 213-6. ISSN: 1934-578X.

HALAMOVÁ, K., KOKOŠKA, L., FLESAR, J., SKLENIČKOVÁ, O., **SVOBODOVÁ, B.**, MARŠÍK, P. In vitro antifungal effect of black cumin seed quinones against dairy spoilage yeasts at different acidity levels. *Journal of Food Protection*. 2010, roč. 73, č. 12, s. 2291-5. ISSN: 0362-028X.

SVOBODOVÁ, B., ORSÁK, M., LACHMAN, J., VADLEJCH, J., KOKOŠKA, L. Evaluation of in vitro antioxidant activity of selected Peruvian medicinal plants. *Planta Medica*, 2009, roč. 75, č. 9, s. 940 - 941. ISSN: 0032-0943.

KLOUČEK P., **SVOBODOVÁ B.**, POLESNÝ Z., LANGROVÁ I., SMRČEK S., KOKOŠKA L. Antimicrobial activity of some medicinal barks used in Peruvian Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, č. 111, s. 427-429. ISSN: 0378-8741

KLOUČEK P., POLESNÝ Z., **SVOBODOVÁ B.**, VLKOVÁ E., KOKOŠKA L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, č. 99, s. 309-312. ISSN: 0378-8741

Příspěvky v recenzním řízení v periodických s impakt faktorem

SVOBODOVÁ, B., POLESNÁ, L., ORSÁK, M., VADLEJCH, J., LACHMAN, J., KUBÁŇ, V., KOKOŠKA, L. Evaluation of In Vitro Antioxidant Activity of Peruvian Medicinal Plant Extracts. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. (11/2019)

STROPNICKÝ, M., TAUCHEN, J., LAPAČKOVÁ, J., KOUYATE, A. M., VAN DAMME, P., **SVOBODOVÁ, B.**, KOKOŠKA, L. Antioxidant capacity of bark extracts from Malian medicinal plants. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. (11/2019)

Příspěvky v recenzovaných periodických bez impakt faktoru

PHAN, T.T.D., BITTOVÁ, M., MIKULÁŠEK, K., KUBÁŇ, V., KRÁČMAR, S., VALÁŠEK, P., **SVOBODOVÁ, B.** Content of 4(5)-methylimidazole, caffeine and chlorogenic acid in commercial coffee brands. *Potravinářstvo*, 2015, č. 9, s. 31-38.

ŠIVEL, M., FIŠERA, M., KLEJDUS, B., KRÁČMAR, S., KUBÁŇ, V., GOLIAN, J., **SVOBODOVÁ, B.** Lutein in food supplements available on the markets of the viszegrad countries. *Potravinářstvo*. 2014, č. 8, s. 261-266.

VOJTÍŠKOVÁ, P., ŠVEC, P., KUBÁŇ, V., KREJZOVÁ, E., BITTOVÁ, M., KRÁČMAR, S., **SVOBODOVÁ, B.** Chemical composition of buckwheat plant parts and selected buckwheat products. *Potravinářstvo*. 2014, č. 8, s. 247-253.

Vybrané příspěvky ve sbornících z mezinárodních konferencí

SVOBODOVÁ, B., RAK, J., KUBÁŇ, V., KAŠPÁRKOVÁ, V., ČUBOŇ, J. Fatty acids profile of wild boar fat used for traditional herbal salves in Moravian Slovakia. 23. Silae Congress , 7. – 12. 9. 2014, Marsala, Italy. ISSN 1827-8620.

SVOBODOVÁ, B.; RAK, J.; KUBÁŇ, V.; KOKOŠKA, L.; LEUNER, O. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of *Naucleopsis glabra* (Moraceae) from Peru. 23. Silae Congress , 7. – 12. 9. 2014, Marsala, Italy. ISSN 1827-8620.

Kapitola v knize

SVOBODOVÁ, B., KUBÁŇ, V. : *Solanaceae: A family well-known and still surprising. In: Phytochemicals in Vegetables: A Valuable Source of Bioactive Compounds* (Petropoulos S. A., Ferreira I. C. F. R., Barros L. Eds.). Bentham Science Publishers, 2018, pp. 296-372. Print ISBN: 978-1-68108-740-5, eISBN: 978-1-68108-739-9

Studijní opora

SVOBODOVÁ, B.: *Toxikologie*. Studijní opora, OPVK projekt CZ.1.07/2.2.00/28.0185, Univerzita Tomáše Bati, 2015. Digitální kopie ve formátu PDF dostupná z (URN): http://vyuka.flkr.utb.cz/pluginfile.php/8024/mod_folder/content/0/Texty%20OPVK%20Toxikologie.pdf?forcedownload=1

ŽIVOTOPIS AUTORA

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno: RNDr. Blanka Svobodová
Datum narození: 7. září 1979
E-mail: bsvobodova@utb.cz

VZDĚLÁNÍ

2013+ Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická
doktorské studium v oboru **Technologie potravin**
2010 Karlova Univerzita v Praze, Přírodovědecká fakulta
titul RNDr v oboru **Klinická a toxikologická analýza**
2006 - 9 Česká zemědělská univerzita v Praze,
doktorské studium v oboru **Agrikultura tropů a subtropů**
2004 - 6 Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
magisterské studium v oboru **Klinická a toxikologická analýza**

ODBORNÁ PRAXE

2016 *Erasmus+*, Instituto Politecnico de Beja, **Portugalsko**, 2 měsíce
2016 *Erasmus+*, Instituto Politecnico de Braganca, **Portugalsko**,
4 měsíce
2015 16. škola hmotnostní spektrometrie, Frymburk (13. – 18. září)
2014+ *Freemover*, Livet Ltd., **Trinidad and Tobago**, opakovaně
Odborný konzultant v oblasti chemie a toxikologie potravin,
výživových doplňků a přírodních produktů. Odborné semináře,
workshopy a pořady v rádiu ohledně výživy, problematiky chemie
v potravinách atd.
2014 *Lektor semináře předmětu* Základy toxikologie, Univerzita Tomáše
Bati ve Zlíně, Fakulta logistiky a krizového řízení
2013 *Pracovní stáž pro PhD studenty*, Slovenská poľnohospodárska
univerzita v Nitre, **Slovenská Republika**, 2 měsíce
2009 *Pracovní stáž pro PhD studenty*, Department of Chemistry,
University of West Indies, St. Augustine campus, **Trinidad and
Tobago**, 2 měsíce
2008 *Erasmus*, Centro de Investigación de Química Ambiental,
Universidad Politécnica de Valencia, **Španělsko**, 6 měsíců
2006 – 2008, 2002 *Laborant*, Ústav organické chemie a biochemie AV
ČR, sekce Steroidy: Syntéza derivátů brassinosteroidů.

PROJEKTY

- 2017 *Použití přídatných a jiných funkčních látek ve vybraných potravinách. IGA/FT/2017/004, spoluřešitel*
- 2016 *Aplikace přídatných a jiných funkčních látek ve výrobě vybraných potravin. IGA/FT/2016/003, spoluřešitel*
- 2015 *Studium funkce vybraných přídatných a biologicky aktivních látek v potravinách. IGA/FT/2015/004, spoluřešitel*
- 2014 *Aplikace fosforečnanů a hydrokoloidů do vybraných potravin. IGA/FT/2014/001, spoluřešitel*
- 2008-2012 *Využití synbiotik a rostlinných extraktů ve výživě lidí a zvířat. Grantová agentura České republiky GAČR 525/08/H060, spoluřešitel*
- 2008-2009 *Peruánské léčivky jako zdroj nových biologicky aktivních látek. Celouniverzitní interní grant CIGA 200085001, hlavní řešitel*
- 2008 *Využití antimikrobiální aktivity esenciálních olejů v plynné fázi pro konzervaci potravin. Celouniverzitní interní grant CIGA 20082009, spoluřešitel*
- 2008 *Analýza biologicky aktivních látek z peruánských léčivých rostlin *Naucleopsis glabra* a *Pterocarpus rohrii*. Interní grant IG 3109/2008, hlavní řešitel*
- 2007 *Antioxidační aktivita vybraných léčivých rostlin z Peru. Interní grant IG 8/2007, hlavní řešitel*

Vědecké identifikátory autora (k 9.11.2020)	Blanka Svobodová
Researcher ID/Publons	B-1126-2014
publikace	16
citovanost	150
h-index	5
Orcid ID	0000-0003-1212-4919
Scopus Author ID:	56584328700