

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení farmakologicky účinných látek ve vzorcích jitrocele kopinatého
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Anna Rylichová**
Osobní číslo: **C18072**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Stanovení farmakologicky účinných látek ve vzorcích jitrocele kopinatého**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na problematiku farmakologicky účinných látek vyskytujících se v rostlinách z čeledi jitrocelovitých (Plantaginaceae). Zaměřte se především na popis farmakokinetických a farmakodynamických vlastností iridoidního glykosidu aukubinu.
2. Popište, jaké analytické metody lze použít pro stanovení aukubinu v rostlinných vzorcích. Zvláštní pozornost věnujte zejména problematice přípravy vzorku k analýze a podmínkám uchování vzorků tak, aby nedocházelo ke ztrátám analytu. Uveďte, jaký je typický obsah aukubinu v rostlinách z čeledi jitrocelovitých a které podmínky ovlivňují jeho obsah v rostlinném materiálu.
3. Navrhněte metodiku stanovení aukubinu ve vzorcích jitrocele kopinatého pomocí HPLC, funkčnost metody ověřte při stanovení různě zpracovaných reálných vzorků.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 „Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací“ v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Veškerá dostupná odborná literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Kateřina Hrdá**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Datum zadání bakalářské práce: **26. února 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem: Stanovení farmakologicky účinných látek ve vzorcích jitrale kopinatého jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 12. 7. 2021

Anna Rylichová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce panu prof. Ing. Miloslavu Pouzarovi, Ph.D. za odborné rady a pomoc při vypracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Kateřině Hrdé, Ph.D. a Ing. Jiřímu Cuhorkovi, Ph.D., kteří mě vedli v rámci praktické části mé práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, za morální, psychickou i materiální podporu po celou dobu mého studia.

ANOTACE

V rámci této bakalářské práce je řešena problematika farmakologicky aktivních látek v rostlinách z čeledi jitrocelovitých. Úvod teoretické části je věnován jitroceli kopinatému (*Plantago lanceolata*), který je uveden jako jeden ze zástupců této čeledi. V další části byl detailně popsán iridoidní glykosid aukubin, a to především jeho farmakologické a farmakokinetické parametry. Zvláštní pozornost pak byla věnována jednotlivým analytickým metodám ke stanovení aukubinu v jitroceli. Poté je zmíněno správné skladování vzorků jitrocele, tak aby nedošlo ke ztrátě analytu. V experimentální části je popsáno stanovení aukubinu v reálných vzorcích jitrocele pomocí HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie).

KLÍČOVÁ SLOVA

HPLC, aukubin, příprava vzorku, skladování vzorku, extrakce, jitrocel, farmakokinetika, farmakologie, iridoidní glykosid

ANNOTATION

This bachelor thesis works with the issue of pharmacologically active substances in plants of the plantain family. The introduction to the theoretical part is devoted to plantain (*Plantago lanceolata*), which is listed as one of the member of this family. In the next part, the iridoid glycoside aucubin was described in detail, especially its pharmacological and pharmacokinetic parameters. Special attention was paid to individual analytical methods for the determination of aucubin in plantain. How to storage plantain samples properly is then mentioned so that no analyte is lost. The experimental part describes the determination of aucubin in real samples of plantain by HPLC (high performance liquid chromatography).

KEYWORDS

HPLC, aucubin, sample preparation, storage, extraction, plantain, pharmacokinetics, pharmacology, iridoid glycoside

OBSAH

| | |
|---|----|
| SEZNAM OBRÁZKŮ | 9 |
| SEZNAM TABULEK | 10 |
| ÚVOD | 11 |
| 1. TEORETICKÁ ČÁST | 12 |
| 1.1. Čeleď jitrocelovité..... | 12 |
| 1.2. Rod jitrocel..... | 12 |
| 1.3. Bioaktivní sloučeniny obsažené v jitroceli | 13 |
| 1.3.1. Fenolické sloučeniny – flavonoidy | 13 |
| 1.4. Ostatní bioaktivní sloučeniny..... | 15 |
| 1.5. Těžké kovy | 15 |
| 1.6. Iridoidní glykosidy | 17 |
| 1.7. Aukubin..... | 17 |
| 1.8. Farmakokinetika..... | 20 |
| 1.9. Farmakologie..... | 22 |
| 1.9.1. Antioxidační a protizánětlivé účinky | 22 |
| 1.9.2. Hepatoprotekce | 23 |
| 1.9.3. Neuroprotekce..... | 23 |
| 1.9.4. Působení na pohybové ústrojí | 24 |
| 1.10. Analytické metody využitelné pro stanovení aukubinu | 24 |
| 1.11. Extrakce | 25 |
| 1.12. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie | 27 |
| 1.13. Jednotlivé analytické metody ke stanovení aukubinu | 28 |
| 1.14. Skladování vzorků jitrocele | 30 |
| 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 32 |
| 2.1. Vzorky..... | 32 |

| | | |
|------|--|----|
| 2.2. | Příprava vzorků k analýze | 32 |
| 2.3. | Optimalizace parametrů HPLC pro stanovení aukubinu | 33 |
| 2.4. | Optimalizované parametry HPLC | 33 |
| 2.5. | Kalibrační závislost | 36 |
| 3. | VÝSLEDKY A DISKUZE | 37 |
| 3.1. | Kalibrace | 39 |
| 3.2. | Reálné vzorky | 40 |
| | ZÁVĚR | 46 |
| | POUŽITÁ LITERATURA | 47 |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek č. 1: Strukturní vzorec luteolinu a luteolin-7-glukosidu | 13 |
| Obrázek č. 2: Strukturní vzorec apigeninu a apigenin 6,8-di-C-glukosidu..... | 14 |
| Obrázek č. 3: Strukturní vzorec kyseliny 4-hydroxyskořicové | 14 |
| Obrázek č. 4: Schéma degradace aukubinu ve vodném prostředí | 18 |
| Obrázek č. 5: HPLC-UV chromatogram standardu aukubinu v okolí vlnové délky 210 nm | 34 |
| Obrázek č. 6: Detail analytické čáry aukubinu..... | 35 |
| Obrázek č. 7: HPLC-UV chromatogram demi vody v okolí vlnové délky 210 nm..... | 35 |
| Obrázek č. 8: HPLC-UV chromatogram demi vody a metanolu v okolí vlnové délky 210 nm | 36 |
| Obrázek č. 9: Graf zobrazující kalibrační křivku závislosti plochy píku na koncentraci aukubinu (mg/ml) | 40 |
| Obrázek č. 10: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek 1 – jitrocel řezanka | 41 |
| Obrázek č. 11: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek 2 – jitrocel řezanka | 42 |
| Obrázek č. 12: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek A – jitrocel listy..... | 42 |
| Obrázek č. 13: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek C – jitrocel listy..... | 43 |
| Obrázek č. 14: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek D – jitrocel listy..... | 43 |
| Obrázek č. 15: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek B – jitrocel listy..... | 43 |
| Obrázek č. 16: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek I – jitrocel nať | 44 |
| Obrázek č. 17: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek II – jitrocel nať | 44 |
| Obrázek č. 18: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek III – jitrocel nať | 44 |
| Obrázek č. 19: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek IV – jitrocel nať | 45 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tabulka 1: <i>Obsah těžkých kovů (mg/kg) v listech jitrocele kopinatého pěstovaného v půdách pocházejících z městské a postindustriální oblasti</i> | 16 |
| Tabulka 2: <i>Závislost poločasu rozpadu aukubinu na pH při různých teplotách</i> | 19 |
| Tabulka 3: <i>Závislost poločasu rozpadu aukubinu na iontové síle média při stabilní hodnotě pH = 4.01 a teplotě 37 °C</i> | 19 |
| Tabulka 4: <i>Postupy extrakce aukubinu pro následnou analýzu pomocí HPLC</i> | 25 |
| Tabulka 5: <i>Údaje o analytických postupech stanovení aukubinu</i> | 29 |
| Tabulka 6: <i>Vliv složení mobilní fáze a objemu nástríku na parametry analytické čáry aukubinu při teplotě 25 °C a průtoku 0,8 ml/min</i> | 37 |
| Tabulka 7: <i>Vliv teploty a složení mobilní fáze na retenční čas analytické čáry aukubinu</i> | 38 |
| Tabulka 8: <i>Vliv průtoku a složení mobilní fáze na retenční čas analytické čáry aukubinu</i> | 38 |
| Tabulka 9: <i>Srovnání vlivu průtoků a složení mobilní fáze na retenčním času analytické čáry aukubinu</i> | 38 |
| Tabulka 10: <i>Analytické údaje pro aukubin při použití 4 % acetonitrilu, průtoku 0,6 ml/min, teplotě 30 °C a dávce 20 µL</i> | 39 |
| Tabulka 11: <i>Závislost koncentrace kalibračního roztoku aukubinu na průměrné ploše píku</i> 39 | |
| Tabulka 12: <i>Změřené analytické údaje pro reálné vzorky – řezanka</i> | 41 |
| Tabulka 13: <i>Změřené analytické údaje pro reálné vzorky – jitrocel listy (granule)</i> | 41 |
| Tabulka 14: <i>Změřené analytické údaje pro reálné vzorky – jitrocel nať (granule)</i> | 41 |

ÚVOD

V této bakalářské práci bylo zpracováno téma: Stanovení farmakologicky účinných látek ve vzorcích jitrocele. V rešeršní části jsou zmíněny informace o čeledi jitrocelovitých a rodu jitrocel. Zvláštní pozornost je věnována bioaktivním sloučeninám v jitroceli, především pak samotnému iridoidnímu glykosidu aukubinu. Jsou zde diskutovány zejména jeho farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti.

Další část je zaměřena na analytické metody, kterými lze aukubin v jitroceli stanovit. Zmiňována je také příprava a skladování vzorků, tak aby nedošlo ke ztrátám analytu.

V rámci experimentální práce byla podle zdrojů z literatury navržena a optimalizována metodika stanovení aukubinu z jitrocele kopinatého pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Její funkčnost byla následně ověřena na reálných vzorcích.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Čeleď jitrocelovité

Do čeledi jitrocelovitých se řadí bezmála 90 rodů a přes 1900 druhů rostlin. Tato čeleď je velice rozmanitá a je rozšířena téměř kosmopolitně. Rostliny z této čeledi se vyskytují hlavně v mírném podnebném pásu, jedná se převážně o byliny nebo keře. Významným rodem z této čeledi je rod jitrocel. Mezi jeho nejvýznamnější zástupce patří: jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata*), jitrocel prostřední (*Plantago media*), jitrocel černavý (*Plantago atrata*), jitrocel větší (*Plantago major*), jitrocel přímořský (*Plantago maritima*) a jitrocel asijský (*Plantago asiatica*). [1] [2]

1.2. Rod jitrocel

Jitrocel je nenáročná rostlina, schopná se přizpůsobit širokému rozsahu životních podmínek, proto se v mnoha zemích vysévá na pastviny a přidává se do krmných směsí pro hospodářská zvířata – především ovce, nebo koně. Díky přítomnosti bioaktivních složek působí v bacheru zvířat jako inhibitor fermentace, a tudíž účinkuje jako prevence proti nadýmání. Obsahuje též vysoké procento nutričně významných prvků, jako je vápník, hořčík, sodík, fosfor, zinek a měď. [3]

V mnoha oblastech světa je jitrocel součástí tradiční medicíny. Přípravky z jitrocele se podávají k léčbě široké škály nemocí. Nejčastěji je jitrocel užíván pro léčbu respiračních onemocnění, onemocnění pokožky, reprodukční soustavy, trávicí soustavy, ke snížení horečky nebo k tlumení bolesti. Pro terapeutické účely jsou využívány zejména vodné či alkoholové extrakty připravené z listů, kořenů, či semen dané rostliny. [4]

Jitrocel je hojně terapeuticky využíván zejména proto, že obsahuje velké množství bioaktivních látek. Jedná se například o flavonoidy, alkaloidy, terpenoidy, fenolické sloučeniny (deriváty kyseliny kávové), iridoidní glykosidy, mastné kyseliny, tříslivé kyseliny, polysacharidy a vitamíny. [5]

Jedním ze zástupců tohoto rodu je například jitrocel kopinatý. Jitrocel kopinatý (latinsky *Plantago lanceolata*) je krátkověká trvalka z čeledi jitrocelovitých (*Plantaginaceae*) a z řádu

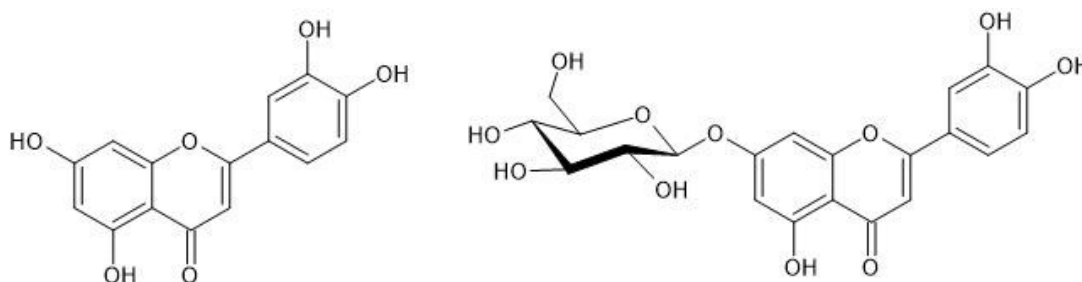
hluchavkotvaré (*Lamiales*). Jitrocel kopinatý dorůstá do výšky 10–50 cm a je charakteristický svislým krátkým přímým podélně pětihranným stvolem, krátkým oddenkem a rozsáhlým kořenovým systémem. Listy kopinatého tvaru tvoří přizemní růžici, ze které vychází jeden nebo více stvolů. Listy jsou po celém okraji zubaté. Každý list bývá 3–7 žilný, vzpřímený a špičatý. Z každého stvolu vyrůstá jedno květenství, které je tvořeno z krátkých klasů válcovitého nebo kulovitě vejčitého tvaru. Z klasů vystupují hnědé suchomázdřité listeny. Bílé tyčinky, vyrůstající z kalichů tvořících klas, mají na konci žluté prašníky. Na vrcholu klasu se nachází semeník. Jitrocel kvete od května do září, opylován je nejčastěji větrem. Plody jitrocele, které dozrávají po odkvětu, mají podobu vejčitých tobolek obsahujících dvě načervenalá semena. Obal semen slizovatí. [6] [7] [8]

Mezi místa s nejvyšším výskytem jitrocele patří louky a pastviny Evropy, ale také mírná pásma Asie, jihu Austrálie, severu Afriky nebo území Severní Ameriky. Oblasti výskytu jitrocele se postupem času rozšířily a v dnešní době ho lze nalézt téměř po celém světě. [9]

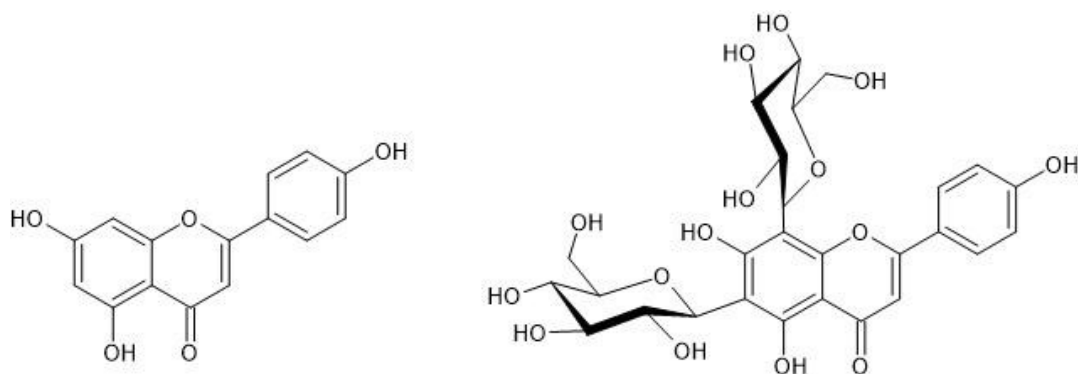
1.3. Bioaktivní sloučeniny obsažené v jitroceli

1.3.1. Fenolické sloučeniny – flavonoidy

Flavonoidy patří mezi polyfenolické přírodní sloučeniny, tvořené dvěma substituovanými benzenovými cykly a jedním pyranovým, který je kondenzovaný s jedním z benzenových cyklů. Tyto sloučeniny jsou charakteristické svými výraznými antioxidačními účinky a celkově příznivými účinky na zdraví. [10] Mezi nejvýznamnější flavonoidy vyskytující se převážně v listech jitrocele patří takzvané flavony, což jsou flavonoidy, které obsahují dvojnou vazbu mezi 2. a 3. uhlíkem. V pozici 4 je na uhlíku navázán dvojnou vazbou kyslík. [11] Z těchto flavonů jsou v jitroceli nejvíce zastoupené luteolin (respektive luteolin-7-glukosid a luteolin-7-glukogalaktosid) a apigenin (respektive apigenin-6,8-di-C-glukosid). [12]

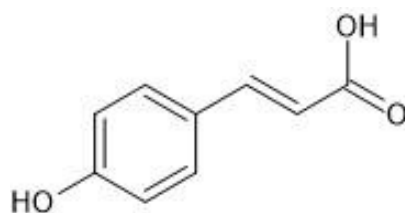


Obrázek č. 1: Strukturální vzorec luteolinu a luteolin-7-glukosidu



Obrázek č. 2: *Strukturní vzorec apigeninu a apigenin 6,8-di-C-glukosidu*

Druhou nejvíce zastoupenou látkou ze skupiny fenolů v jednotlivých částech jitrocele je kyselina 4-hydroxyskořicová. Její obsah činí přibližně 10–18 % celkových fenolických sloučenin přítomných v této rostlině. Nejvyšší obsah kyseliny 4-hydroxyskořicové byl zaznamenán v listech (12,3 % z celkového obsahu fenolických látek), následoval květ, stonek, kořeny a semena. Kyselina 4-hydroxyskořicová má také velice silné antioxidační účinky. [13]



Obrázek č. 3: *Strukturní vzorec kyseliny 4-hydroxyskořicové*

Jak flavonoidy, tak kyselina 4-hydroxyskořicová jsou rozpustné ve vodě, proto se v tradiční medicíně využívají hlavně vodné odvary z rostlin, které tyto sloučeniny obsahují. Terapeutický účinek těchto látek souvisí zejména s jejich antioxidačními účinky. Dané látky jednak přímo urychlují terminační reakce volných radikálů v organismu a dále též zvyšují aktivitu antioxidačních enzymů. Fenolické sloučeniny také vykazují výrazné protizánětlivé vlastnosti a jsou schopné vyvolat apoptózu rakovinných buněk. Epidemiologické studie prokázaly, že strava bohatá na polyfenolické sloučeniny (speciálně flavonoidy) má pozitivní účinky z hlediska výskytu kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny. [14]

1.4. Ostatní bioaktivní sloučeniny

Dalšími bioaktivními látkami vyskytujícími se v jitroceli (zejména listech) jsou alkaloidy indikain a plantagonin. Tyto látky pozitivně působily proti průjmu, vyvolanému ricinovým olejem. K léčbě průjmu přispívala i přítomnost tříslovin, které jsou také obsaženy v listech jitrocele. V jitroceli byly dále nalezeny deriváty kyseliny kávové, jmenovitě verbaskosid a plantamajosid. Plantamajosid účinně působil proti aktivitě volných radikálů způsobujících oxidativní stres a také dokázal působit příznivě při hojení ran.

Další skupinou látek, které se hojně vyskytují v jitroceli, zejména v listech a semenech, jsou mastné kyseliny. Pomocí plynové chromatografie a spektrofotometrie byla v jitroceli detekovány kyselina palmitová, stearová, olejová, linolová a linolenová. Ze semen pak byla izolována i kyselina myristová. Ze semen jitrocele byly také izolovány sacharidy. Jmenovitě se jednalo o aldózy arabinózu, xylózu a galakturonovou kyselinu. Z ketóz se v jitroceli vyskytuje například sorbitol, a to v množství až 2 % suché hmotnosti extrahovaného vzorku. Jitrocel je také zdrojem vitamínu C a karotenoidů. Z jitrocele byly izolovány kyselina askorbová a provitamin vitamínu A: β -karoten. [2] [3] [4] [5] [15]

1.5. Těžké kovy

Obsah těžkých kovů (Cu, Pb, Zn, Cd, Cr, Ni) v listech jitrocele byl zjišťován ve studii Levei a spol. (2018) u rostlin pěstovaných v půdách pocházejících ze dvou oblastí v Rumunsku. První vzorky pocházely z půdy městské oblasti (Kluž), kde k hlavním zdrojům znečištění patřila doprava, lokální topeniště a skládkování komunálního odpadu. Druhou oblastí bylo postindustriální město Baia-Mare, kde docházelo k největšímu znečištění půdy těžkými kovy díky bývalým závodům na zpracování rud vzácných kovů. Jak je zřejmé z **Tab. 1.**, průměrná koncentrace Zn a Pb byla vyšší v rostlinách pěstovaných v půdách z postindustriální oblasti (73,8 mg/kg a 2,4 mg/kg), oproti rostlinám pěstovaným v půdách z městské oblasti (26,5 mg/kg a 0,49 mg/kg). Mohlo to být zapříčiněno vyšší mírou znečištění postindustriální oblasti, a to jak z městských, tak z průmyslových zdrojů. Obsahy Ni, Cr a Cd byly pro obě oblasti srovnatelné, a výrazně nižší než obsah Cu a Zn, což naznačuje, že má jitrocel toleranci k výše zmíněným kovům, a i při jejich vysoké koncentraci v půdě nedochází k jejich kumulování v rostlině. [16]

Tabulka 1: Obsah těžkých kovů (mg/kg) v listech jitrocele kopinatého pěstovaného v půdách pocházejících z městské a postindustriální oblasti

| Koncentrace těžkého kovu [mg/kg] | | |
|----------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| | Městská oblast /Kluž/ | Postindustriální oblast /Baia Mare/ |
| Cu | 7,15 | 9,61 |
| Pb | 0,49 | 2,4 |
| Zn | 26,5 | 73,8 |
| Cd | 0,14 | 0,49 |
| Cr | 1,50 | 1,25 |
| Ni | 2,88 | 2,67 |

V další studii zaměřující se na detekci těžkých kovů v jitroceli (Bekteshi a spol., 2013) bylo porovnáváno množství těžkých kovů v listech jitrocele z různých oblastí v regionu Durrës v Albánii. Také v rámci této studie byly nejvyšší obsahy Pb a Zn (74,3 mg/kg a 154,3 mg/kg) zjištěny ve znečištěné průmyslové oblasti, a naopak nejnižší ve vzorcích pocházejících z oblasti neobydlené (22,3 mg/kg a 47,3 mg/kg). Koncentrace niklu v jitroceli se ve vzorcích z jednotlivých oblastí téměř nelišila (46 mg/kg a 39,5 mg/kg). Stanovené koncentrace Cu byly u vzorků z průmyslové oblasti 24 mg/kg a z neobydlené oblasti 5,3 mg/kg, což jsou hodnoty o něco vyšší, než jaké uváděli autoři výše zmíněné rumunské studie. [17]

Ve třetí studii na dané téma (Nadgórska – Socha a spol., 2013) byl porovnáván obsah těžkých kovů v jitroceli kopinatém z oblasti v severní části Polska. Byly porovnávány vzorky listů z rostlin sesbíraných v oblasti s půdou kontaminovanou těžkými kovy a nekontaminovanou půdou. Nejvyšší rozdíl v koncentraci byl zjištěn v případě Pb, přičemž v kontaminované oblasti byl obsah Pb v jitroceli 107,2 mg/kg oproti 0,03 mg/kg v oblasti nekontaminované. V případě Zn byl rozdíl v koncentracích také značný a to 372,9 mg/kg a 101,3 mg/kg. V této studii bylo také stanovováno Fe. Obsah Fe v jitroceli z kontaminované a nekontaminované oblasti byl přibližně stejný a to 232 a 218,7 mg/kg. [18]

V poslední studii (Galal a spol., 2015) byl sledován vliv vzdálenosti stanoviště od dálnice (Zagaziz – Banha, Egypt) na obsah těžkých kovů v jitroceli. Nejvyšší koncentrace v mg/kg Cu (77,9), Pb (5,6), Zn (68,7), Cd (0,5), Cr (73,4) a Ni (9,2) byly detekovány ve vzorcích z jitrocelů rostoucích ve vzdálenosti 20–100 m od dálnice. V této studii byl také stanovován obsah dalších

kovů, přičemž nejvyšších koncentrací v mg/kg dosahoval Mn (98,5), Al (24 215) a Fe (3774,5). Hlavním zdrojem kontaminace bylo v daném případě dlouhodobé a intenzivní dopravní zatížení studované lokality [19]

1.6. Iridoidní glykosidy

Nejvíce zastoupenými iridoidními glykosidy v jitroceli kopinatém jsou aukubin a katalpol. Z jitrocele však byly izolovány i další zástupci této skupiny látek jako například verbaskosid, asperulosid, 10-O-(3,4-dimetoxy-(E)-cinnamoyl)-katalpol a metylester kyseliny deacetyl-asperulosidové. Ve studii Ronsted a spol. (2003) byl stanovován obsah iridoidních glykosidů přítomných v jitroceli větším (*Plantago major*) Ve vzorku se vyskytovaly následující látky: aukubin (0,1 hm%), gardosid (0,02 hm%), mellitosid (0,01 hm%) a již výše zmíněný plantamajosid (0,4 hm%). [2] [15]

Ve studii Hasan a spol. (2018) a ve studii Jurišić a spol. (2004) bylo uvedeno, že nejvyšší množství aukubinu je obsaženo listech jitrocele. Jeho celkový obsah závisí na době sběru, podmínkách růstu a stáří rostliny. Naměřené množství aukubinu v listech jitrocele se v některých případech dostalo až na hodnotu 4,8 hm% v závislosti na době sklizně, přičemž průměrné množství se v literatuře uvádí kolem 2 %. [20] [21] [22]

Menší množství aukubinu pak obecně obsahují plody jitrocele (kolem 1 hm%) a kořeny 1 - 2 hm%. [23] [24]

Ve studii Sertić a spol. (2015) bylo porovnáváno množství aukubinu v jednotlivých částech rostlin z rodu *Globularia* (Koulenky), které patří do čeledi jitrocelovitých. Nejvyšší podíl aukubinu obsahovaly listy a květy, kdy bylo detekované množství v některých případech 2 mg/g suchého vzorku (0,2 %). Co se týče stonku průměrná hodnota koncentrací aukubinu z různých druhů Koulenek byla 0,6 mg/kg suchého vzorku (0,06 %). Detekované množství z kořenů rostlin z rodu *Globularia* bylo naměřeno takto: 0,71 mg/g (0,071 hm %). [25]

1.7. Aukubin

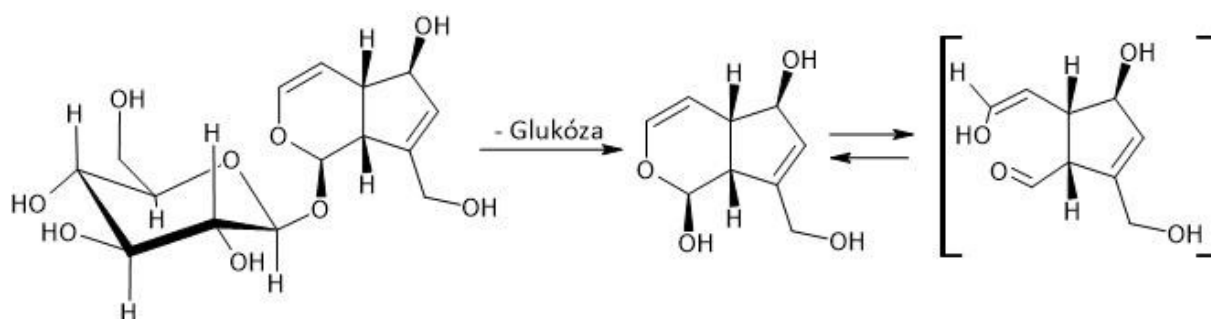
Aukubin, systematickým názvem 1,4,5,7a-tetrahydro-5-hydroxy-7-hydroxymethylcyklopenta(c)pyran-1-yl-β-D-glukopyranosid, je látka přírodního původu, patřící do skupiny iridoidních glykosidů. Vyskytuje se ve tkáních celé řady rostlin jako je například

gumojilm jilmový (*Eucommia ulmoides*), aukuba japonská (*Aucuba japonica*) nebo jitrocel asijský (*Plantago asiatica*). Pro farmakologické vlastnosti je aukubin hojně využíván mimo jiné i v tradiční Čínské medicíně. [26]

Tento glykosid působí jako antioxidant, což se na buněčné úrovni a na úrovni organismu projeví potlačením zánětlivých reakcí a zpomalením rozvoje fibrózy plic [27] či stárnutím pleti. [26] Aukubin je také využíván jako významné antidotum při otravě hepatotoxickými látkami jako jsou α -amanitin nebo tetrachlormetan (CCl_4). Jak α -amanitin tak CCl_4 způsobují v hepatocytech inhibici biosyntézy RNA, proti které aukubin účinně zasahuje. [28]

Aukubin má ve své struktuře glykosidovou vazbu. V kyselém prostředí dochází k její degradaci a oxidaci a aukubin se štěpí na aglykon aukubigenin, glukózu a další produkty. Schéma degradace je znázorněno na **Obr. 4**. V případě aglykonu dochází ve vodném prostředí k rozštěpení poloacetalové vazby a otevření kruhu vede ke vzniku dialdehydu. Následně může dojít k intramolekulárnímu přesmyku na stabilní izomer. [26]

Ve vodném prostředí také snadno dochází k hydrolyze glykosidové vazby pomocí enzymatického štěpení β -glykosidázou, která je přítomna v lidském těle. [29]



Obrázek č. 4: Schéma degradace aukubinu ve vodném prostředí

Ve studii Chun a Cho (1995), která se zaměřovala se na vliv pH, teploty, iontové síly a iontů na rozpad aukubinu, bylo zjištěno, že aukubin je nejvíce stabilní při pH kolem 10. Aukubin se rozpadal podle kinetiky I. řádu, jelikož závislost logaritmu koncentrace na čase měla lineární průběh. Se snižujícím se pH byl rozpad aukubinu rychlejší. V silně kyselém prostředí byla stabilita aukubinu nejnižší a aukubin zde byl degradován nejrychleji, jak dokazují hodnoty v **Tab. č. 2**. [30]

Tabulka 2: Závislost poločasu rozpadu aukubinu na pH při různých teplotách

| pH | t _{1/2} (dny); 37 °C | t _{1/2} (dny); 60 °C | t _{1/2} (dny); 70 °C |
|------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 2,1 | 0,543 | 0,056 | 0,0106 |
| 4,9 | 134,86 | 19,15 | 1,557 |
| 7,16 | 607,19 | 330,27 | 34,6 |
| 9,07 | 1270,38 | 936,6 | 164,61 |
| 9,65 | 1062,53 | | 205,46 |

Z výsledků v tabulce lze odvodit, že při měření rozpadu aukubinu v prostředích o stejném pH, se aukubin za vyšší teploty rozpadá rychleji než při teplotě nižší.

Ve studii Wang a spol. (2020) byl také sledován vliv pH na degradaci aukubinu. Jako v předchozí studii byly nejnižší hodnoty poločasů rozpadu aukubinu stanoveny při kyselém pH. Poločasy rozpadu aukubinu při pH 1,2, 1,6 a 2 měly následující hodnoty: 5,02, 5,78 a 14,84 hodiny (měřeno při teplotě 37 °C). Při pH nad 3 se již poločas rozpadu pohyboval v řádech několika dní. [13]

Na hodnotu poločasu rozpadu aukubinu má také vliv iontová síla média. Se zvyšující se iontovou silou se snižuje stabilita aukubinu. [30]

Tabulka 3: Závislost poločasu rozpadu aukubinu na iontové síle média při stabilní hodnotě pH = 4.01 a teplotě 37 °C

| Iontová síla (mol/l) | 0,345 | 0,5 | 0,7 | 1 | 1,5 |
|------------------------|-------|-------|-------|------|------|
| t _{1/2} (dny) | 15,09 | 12,89 | 10,49 | 7,83 | 5,94 |

Aukubin je špatně rozpustný v nepolárních rozpouštědlech (ether, chloroform, benzen), což dokazuje nízká hodnota rozdělovacího koeficientu oktanol/voda $5,6234 \times 10^{-3}$. Z polárních rozpouštědlech je pak dobře rozpustný v metanolu, etanolu a dimetylsulfoxidu, Nejsnadněji se aukubin rozpouští v různých pufrch v rozmezí pH od 3 do 10. [28] [30] [31]

Rozpustnost aukubinu ve vodě při 25 °C je odhadována na 15 mg/mL [32]

1.8. Farmakokinetika

Přestože existují některé studie zaměřené na popis distribuce aukubinu v těle, komplexní studie zabývající se celkovou farmakokinetikou aukubinu nebyla, v rámci odborné literatury, doposud zveřejněna.

Ve studii Suh a kol. (1991) byla sledována závislost koncentrace aukubinu v krevní plazmě na čase u potkanů, kterým bylo podáno 40–400 mg/kg látky intravenózně. Hodnoty farmakokinetických parametrů se po podání různě velkých dávek významně nelišily. Výjimkou byl parametr AUC (area under the curve; plocha pod křivkou), jehož hodnota byla na velikosti podané dávky závislá. Při podání 40 mg/kg látky byla stanovena hodnota biologického poločasu ($t_{1/2}$) 42,5 minuty a při dávce 100 mg/kg 50,9 minuty, celková plazmatická clearance (CL_t) 7,2 ml/min/kg a 7,4 ml/min/kg, distribuční objem (V_d) 347 ml/kg a 383 ml/kg a plocha pod křivkou (AUC) 6110 $\mu\text{g} \cdot \text{min/ml}$ a 13 550 $\mu\text{g} \cdot \text{min/ml}$. Podobná kinetika vylučování byla zjištěna i v rámci studie na laboratorním králíkovi (plemeno novozélandský bílý), kdy byl aukubin podáván intravenózně a žaludeční sondou. Po intravenózní aplikaci 100 mg/kg aukubinu bylo dosaženo těchto hodnot farmakokinetických parametrů: $t_{1/2}$ 40,2 minuty, CL_t 6 ml/min/kg, V_d 215 ml/kg a AUC 15 360 $\mu\text{g} \cdot \text{min/ml}$. [28]

V další studii Zhang a kol. (2014) byl potkanům perorálně podán vodný roztok extraktu z listů *Eucommia ulmoides Oliv.* (2 g/kg) Maximální koncentrace aukubinu v plazmě (C_{max}) o hodnotě 26,786 ng/mL bylo dosaženo zhruba po jedné a po deseti hodinách od podání. Křivka závislosti koncentrace aukubinu v plazmě na čase měla dva vrcholy. Bimodální charakter uvedené závislosti může mít několik příčin. První možností může být rozdělení vylučované látky na dvě frakce, z nichž jedna je z místa vylučování (ledviny, játra) opět vstřebána do krve, což vede k opětovnému nárůstu koncentrace látky v krevní plazmě. Další možností může být enterohepatální cirkulace, kdy je látka opětovně vstřebávána přes játra zpět do krve.[33]

Bimodální charakter závislosti koncentrace látky v krevní plazmě na čase byl pozorován i v případě podávání 50 g/kg extraktu *Eucommia cortex* samcům a samicím potkanů. Prvního vrcholu bylo dosaženo zhruba po 10-25 minutách (C_{max} u samců – přibližně 3900 ng/ml a u samic 1700 ng/ml) a následně dosažení druhé maximální hodnoty koncentrace po 6–10 h od podání dávky. Ani po deseti hodinách od podání extraktu *Eucommia cortex* neklesla koncentrace aukubinu v krevní plazmě pod 1000 ng/ml.[34]

Při podání čistého aukubinu bez doprovodných látek, které se obvykle nacházejí v extraktu z *Eucommia ulmoides*, bylo dosaženo C_{max} látky v krevní plazmě pouze jednou. Lze předpokládat, že dochází k různým interakcím mezi látkami vyskytujícími se v extraktu *Eucommia ulmoides* a aukubinem. Toto tvrzení ale doposud nebylo experimentálně ověřeno. [26] V rámci jednotlivých studií byl pozorován i rozdílný biologický poločas aukubinu, přičemž v případě samotného aukubinu byla naměřena hodnota $t_{1/2}$ $1,073 \pm 0,241$ h [35], oproti Du-zhong extraktu $6,959 \pm 0,28$ [33] nebo pak hodnota $2,68 \pm 1,17$ v případě extraktu z byliny štětky drsné (*Dipsacus esperoides*). [36]

Výrazné odlišnosti ve farmakokinetice aukubinu byly pozorovány i mezi pohlavími. V případě samců potkanů byl aukubin z krve eliminován rychleji než u samic, protože hodnoty CL_T , $t_{1/2}$ a V_d aukubinu bývají u samců nižší než u samic. Naopak v případě C_{max} byla změřena vyšší hodnota u samců než u samic ($3,9 \mu\text{g/ml}$ oproti $1,77 \mu\text{g/ml}$). Jednou z možných příčin rozdílných hodnot mohly být anatomické a fyziologické odlišnosti jednotlivých pohlaví, jako je procento tuku v těle, celkový objem krevní plazmy, průtok krve, střevní mikroflóra nebo působení různých endogenních látek. Druhým faktorem, který musí být brán v potaz je odlišná exprese genů pro tvorbu enzymů zajišťujících metabolismus léčiv. [34]

Absorpce aukubinu probíhala u zvířat poměrně rychle. Doba, za kterou byla dosažena maximální koncentrace aukubinu v krvi, se pohybovala v rozmezí 0,20 – 1,58 h. Biologická dostupnost aukubinu byla výrazně nižší při perorálním podání (19,3 %), než při podání intraperitoneálním (76,8 %) či hepatoenterálním (83,5 %). [26] [28]

V rámci in-vivo studie na potkanech bylo zjištěno, že distribuční objem aukubinu je mnohem nižší než celkový objem tělních tekutin. To poukazuje na nízký stupeň distribuce látky do jednotlivých tkání. Na plazmatické proteiny bylo navázáno méně než 9 % podané látky a až 91 % aukubinu se v krvi nacházelo v nenavázané formě. [28]

Aukubin je obvykle distribuován pouze ve vysoce prokrvených tkáních. Po 5–ti minutách od podání byla největší koncentrace látky naměřena v ledvinách, dále pak v játrech, srdci, slezině a nejméně v plicích. I po 1 h od podání bylo měřitelné množství aukubinu ve všech těchto orgánech. Bylo též zjištěno, že téměř ihned po podání byl aukubin rychle transportován do mozku, přičemž nejvyšší koncentrace byla detekována po 0,083 h. Po uplynutí 1 h již byla koncentrace aukubinu v mozku velice nízká a dále docházelo k jeho postupné eliminaci. [35]

1.9. Farmakologie

1.9.1. Antioxidační a protizánětlivé účinky

Pokud je tělo vystaveno nepříznivým podmínkám, může docházet ke snížení účinnosti antioxidačních mechanismů. Nárůst koncentrace reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňkách následně vede k rozvoji oxidativního stresu.

Z literatury je známo, že oxidativní stres může za vznik řady kardiovaskulárních a neurologických onemocnění či onemocnění pohybové soustavy. Aukubin dokáže působit jako účinný antioxidant. Interakcí aukubinu s ROS dochází k jejich rychlejšímu zániku, tím pádem ROS nemohou způsobit peroxidaci lipidů a nedojde tak ke zvýšení koncentrace biomarkerů oxidativního stresu v buňkách. Dále aukubin dokáže zvyšovat aktivitu antioxidačních enzymů, a to především enzymu kataláza, superoxid dismutáza (SOD), glutathion peroxidáza (Gpx) nebo glutathion-S-transferáza (GST). Studie prokázaly pozitivní antioxidační účinky aukubinu při poškození žaludeční sliznice způsobené etanolem, dále při dysfunkci endotelu nebo remodelaci myokardu. [37] [38] [39]

Aukubin také aktivuje Nrf2 (nuclear factor erythroid-2 related factor) transkripční faktor, který reguluje buněčnou odpověď na oxidativní stres. Díky aktivaci Nrf2 dochází ke zvýšené expresi antioxidačních a detoxikačních proteinů jako jsou hemeoxygenáza-1 (HO-1) a chinon oxidoreduktáza-1. [13]

Ve studii Ho a kol (2005) byla na kožních buňkách fibroblastech studována role aukubinu při vzniku oxidativního stresu způsobeného UVB zářením. Aukubin opět snižoval hladinu ROS, která byla díky UVB záření zvýšená a též došlo ke vzrůstu množství koenzymu glutathionu (GSH). UVB záření způsobuje zvýšenou aktivitu enzymu β -galaktosidázy u senescentních buněk (SA- β -gal), přičemž podání aukubinu inhibovalo aktivitu tohoto enzymu a tím pádem se snížil celkový počet buněk obsahujících β -galaktosidázu spojenou se senescencí.[40]

U aukubinu byly prokázány i výrazné protizánětlivé účinky. V jedné ze studií byl demonstrován účinek aukubinu na produkci prozánětlivého faktoru nádorové nekrózy alfa (TNF- α) a interleukinu 6 (IL-6) u žírných buněk krysí bazofilní leukemie (RBL-2H3) aktivovaných antigenem. Aukubin blokuje transkripční faktor NF- κ B (nukleární faktor kappa B), tím, že nedovolí degradaci a fosforylaci I κ B kinázy, díky čemuž by se spustila kaskáda reakcí vedoucí až k expresi prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-6. [41]

Ve studii Zhang a spol. (2014) byla sledována distribuce aukubinu spolu s kyselinou geniposidovou po orálním podání extraktu z listu keře Gumojilmu jilmového (*Eucommia ulmoides Oliver*) potkanům. [33] Extrakt z listů *Eucommia ulmoides Oliv.* je v čínské medicíně též známý jako čaj Du – zhong. Využívá se zde především pro jeho antioxidační [42], protizánětlivé[43] nebo antibakteriální účinky. [44] Snižuje též množství glukózy v krvi[45]. Dlouhodobé užívání extraktu podávaného hypertenzním krysám vedlo ke zvýšení hladiny oxidu dusnatého v plazmě, který se zásadně podílí na vasodilataci cév. [46]

1.9.2. Hepatoprotekce

Jednou z dalších pozitivních vlastností aukubinu je jeho hepatoprotektivní účinek. Výraznou roli hraje např. při léčbě otravy α -amanitinem. Po intraperitoneálním podání aukubinu se zvýšilo množství přeživších myší ve skupině exponované α -amanitinu oproti negativní kontrole. Alfa-amanitin působí v organismu jako inhibitor biosyntézy RNA v hepatocytech. Aukubin sám o sobě nijak biosyntézu RNA neovlivňoval. Naopak při podání aukubinu spolu s α -amanitinem, působil aukubin proti potlačení syntézy RNA vyvolané α -amanitinem. [47] [48]

Podobné výsledky byly zjištěny i ve studii zaměřené na sledování účinku aukubinu při intoxikaci potkanů tetrachlormetanem (CCl_4). Tato látka způsobuje poškození jater. Aukubin opět snižoval míru inhibice biosyntézy RNA vyvolanou CCl_4 . [49]

1.9.3. Neuroprotekce

U aukubinu byl prokázán výrazný anti-diabetický efekt. Jinými slovy aukubin snižoval hladinu glukózy v krvi a zvyšoval tělesnou hmotnost u potkanů, u kterých byl experimentálně indukován diabetes. Aukubin také dokázal efektivně zvyšovat hladinu anti-apoptického proteinu Bcl-2. Díky tomu nedocházelo ke zvýšené expresi pro-apoptického faktoru BAX a bylo tak zajištěno výrazné snížení množství neuronů, které by podlely apoptóze. Nedošlo tak ke ztrátě neuronů v hipokampu v oblasti CA-1 při diabetické encefalopatii. [50]

Aukubin značně redukoval hladinu NOS (syntáza oxidu dusného) ve tkáni hypotalamu u diabetických potkanů. Zvýšená hladina NOS by vedla k nadprodukcí NO (oxid dusný), který

by reakcí se superoxidovým radikálem vytvořil vysoce toxický anion peroxynitritu, který by způsoboval oxidativní stres. [51]

1.9.4. Působení na pohybové ústrojí

Z dostupných studií vyplývá, že účinky aukubinu proti osteoartróze úzce souvisí s jeho protizánětlivými vlastnostmi, a to například schopností regulovat hladinu pro-zánětlivého faktoru NF- κ B (nukleární faktor kappa B). [26]

Osteoartróza je onemocnění kloubů, které vede k postupnému částečnému poškozování až (v některých případech) k úplnému zničení kloubní chrupavky. Hlavní příčinou je porušení regulace metabolismu chrupavky (jejímu neustálému odbourávání a novotvorby). [52] Díky zvýšené aktivitě cytokinů IL-1 β (Interleukin 1 – beta) dochází k inhibici syntézy katabolických faktorů ze skupiny metaloproteináz. Aktivita IL-1 β se také podílí na uvolňování dalších mediátorů, které poškozují kloubní tkáň. Celá tato škála prozánětlivých dějů vedoucích k osteoartróze je řízena transkripčním faktorem NF- κ B. Aukubin vykazoval antagonistické účinky při tvorbě prozánětlivých mediátorů vyvolaných IL-1 β u chondrocytů studovaných potkanů. Podání aukubinu dokázalo potlačit fosforylaci a translokaci (indukovanou cytokinem IL-1 β) prozánětlivého faktoru NF- κ B do jádra. [53]

Osteoporóza, tedy porucha tvorby kostní tkáně, je spojena s redukcí proliferace a diferenciace osteoblastů. Toto onemocnění se projevuje řídnutím kostní tkáně. Pokud byl v buňkách MG63 (lidské osteoblasty) pomocí H₂O₂ a dexametazonu indukován oxidativní stres, dokázal aukubin tyto buňky ochránit před apoptózou. Aukubin zvýšil expresi cytokinů podílejících se na diferenciaci osteoblastů. Ze zmíněných cytokinů se jednalo zejména o kolagen I, osteokalcin a osteopontin. Aukubin také indukoval expresi genů protizánětlivých faktorů zmírňujících dopady oxidativního stresu. [54] [55]

1.10. Analytické metody využitelné pro stanovení aukubinu

K detekci aukubinu v rostlinných vzorcích je hojně využívána zejména vysoce účinná kapalinová chromatografie. (HPLC). Ve studii Janković a spol. (2010) bylo porovnáváno množství aukubinu ve vzorcích různých druhů jitrocele. Největší množství aukubinu bylo

zjištěno ve tkáních jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata*) a jitrocele černavého (*Plantago atrata*). [56]

Celkový obsah aukubinu v listech jitrocele kopinatého ovlivňuje celá řada parametrů. V jedné ze studií se obsah aukubinu pohyboval v rozmezí 0,2 – 2,1 % v závislosti na místě sklizně. [57] Dalším významným parametrem je doba sklizně. V jedné ze studií se uvádí, že nejvyšší obsah aukubinu byl zjištěn u jitrocele sesbíraného v červenci. Dosahoval hodnoty 3,1 hm%. [58] Na obsah aukubinu má též vliv hustota porostu. V jedné ze studií bylo konstatováno, že nejvyšší hodnota koncentrace aukubinu byla zjištěna v listech jitrocele, který pocházel z porostu, kde plošná hustota aplikovaného osiva nepřevyšovala 3 kg/ha. V rámci dané studie byly vzorky odebrány na konci dubna a maximální koncentrace aukubinu dosahovala hodnoty 2,08 hm% . Dalším vlivným faktorem bylo stádium vývoje rostliny. Nejvyšší obsah aukubinu v listech jitrocele byl získán z rostlin, které měly již zralá semena. Průměrný obsah v tomto případě dosáhl hodnoty 2,59 hm%. [59]

1.11. Extrakce

V případě analýzy aukubinu je třeba nejprve oddělit analyt od pevného podílu tvořeného nerozpustnými částmi rostlinných tkání. V následující tabulce uvádím příklady postupů extrakce aukubinu ze vzorků rostlin pro následnou analýzu látky.

Tabulka 4: Postupy extrakce aukubinu pro následnou analýzu pomocí HPLC

| Analytická metoda použitá po extrakci | Zdroj | Příprava vzorku | Extrakce | Následná separace | Citace |
|---------------------------------------|---------------------------|---|------------------------------------|-------------------|--------|
| HPLC | Jitrocel kopinatý (listy) | sušení vzduchem mletí na prášek (nespecifikováno) | 50 % (v/v) etanol (UV lázeň) | centrifugace | [56] |
| HPLC | Jitrocel kopinatý (listy) | lyofilizace | 25 ml metanolu | třepání | [60] |

| | | | | | |
|------|--------------------------------|--|--|--------------|------|
| | | drcení hmoždířem a tloučkem | (koncentrace nespecifikována) | | |
| HPLC | Rehmánie lepkavá (listy) | zmrazení vzorků při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryogenní mletí v kapalném dusíku | 25 ml 30 % metanolu (UV lázeň) | centrifugace | [61] |
| HPLC | Jitrocel kopinatý | lyofilizace mletí na prášek (nespecifikováno) | 10 ml metanolu (koncentrace nespecifikována) | třepání | [22] |

V této části bych se ráda zaměřila na různé postupy přípravy vzorků pro následnou analýzu aukubinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Jak bylo uvedeno výše, největší množství aukubinu se v případě jitrocele kopinatého vyskytuje v listech (až 3 hm% v závislosti na čase a místě sklizně). V rámci většiny zde citovaných prací byla k extrakci použita právě tato část rostliny. Výjimku tvoří studie Navarrete a spol. (2016), kde část rostliny nebyla přesně specifikována. [22]

Před samotným procesem extrakce byly vzorky vysušeny a následně lyofilizovány. Sušení vzorků bylo ve sledovaných studiích prováděno následovně: ve studii Tamura a spol. (2002) bylo sušení prováděno v peci s nuceným oběhem vzduchu při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jiný způsob sušení byl zaznamenán ve studii Janković a spol. (2010), kdy byly vzorky sušeny pouze vzduchem za teploty okolí kolem $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ a normálního tlaku.

Po procesu sušení bylo nutné vzorek zamrazit. Tato operace byla nutná pro dlouhodobé skladování vzorků s cílem zabránit degradaci analytu. Vzorky byly v jednotlivých studiích mrazeny za různých teplot. V případě studie Navarrete a spol. (2016) byla teplota $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. V některých studiích teplota zmrazení nebyla specifikována, jako například ve studii Tamura a spol. (2002).

Poté bylo možné připravit vzorky k následné analýze. Nejprve probíhal proces mletí. Vzorky byly mlety na prášek, buď kryogenním mletím v kapalném dusíku (mrazení vzorku na

teplotu - 80 °C) nebo ručně hmoždířem s tloučkem. Ve studiích Janković a spol. (2010) a Navarrete a spol. (2016) provedení mletí nebylo nijak specifikováno.

Ve studii Janković a spol. (2010) byla zvolena po předchozích pokusech s jinými rozpouštědly metoda extrakce v 5 ml 50 % etanolu. Oproti tomu studie Navarrete a spol. 2016 a studie Tamura a spol. (2002), které zmiňovaly jako rozpouštědlo metanol. Z výsledků studie Suomi a spol. (1999), kde byly porovnávány extrakce za použití různých rozpouštědel, je zřejmé, že vyšších výtěžků bylo dosaženo při extrakci metanolem než etanolem. Aukubin je v metanolu rozpustnější, jelikož jde o polárnější rozpouštědlo.

Poté co byly vzorky převedeny do roztoku rozpouštědla byla provedena samotná extrakce. Buď centrifugací (Janković a spol. (2010) a Wang a spol. (2016)) nebo třepáním na třepačce za pokojové teploty po dobu 2 hodin (Tamura a spol. (2002) a Wang a spol. (2016)). Po centrifugaci byl k následné analýze použit supernatant bez následného filtrování. Po třepání na třepačce následovala v obou zmiňovaných studiích několikanásobná filtrace pevných vzorků nejprve přes papírové filtry a poté přes stříkačkové filtry o různých rozměrech pórů (0,22 µm, 20 µm, 22 µm). Alikvotní část bylo nutné přefiltrovat, aby došlo k odstranění zbytkových částic vzorku, které by mohly způsobovat zanesení kolony při samotné analýze pomocí HPLC. [22] [56] [60] [61] [62]

1.12. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie, je separační metoda velice často využívaná ke kvantitativní a kvalitativní analýze látek. Mezi výhody HPLC patří zejména její rychlost a citlivost. Dále také spotřeba malého množství vzorku a možnost ji automatizovat. Pomocí HPLC lze analyzovat jak individuální látky, tak i celkem komplikované směsi. K základním prvkům zařízení pro LC patří autosampler (automatický dávkovač vzorků), kolona, termostat, ve kterém je kolona umístěna, detektor a počítač, který výsledná data zpracovává a ukládá. Systém pro HPLC je dále vybaven i vysokotlakým čerpadlem, které umožňuje průtok mobilní fáze kolonou a celým systémem za vysokého tlaku. Běžně jsou využívány tlaky v rozmezí 40–100 MPa. Díky tomu lze využít kratší kolony (než v případě kapalinové chromatografie – LC) s náplní tvořenou velice malými částicemi (<10 µm). V HPLC je proto dosahováno velké účinnosti a rychlosti separace. [63] [64]

1.13. Jednotlivé analytické metody ke stanovení aukubinu

V **Tab. č. 5** jsou shrnuty údaje o postupech stanovení aukubinu v různých typech rostlin z několika řádů (hluchavkotvaré a lomikamenotvaré).

Tabulka 5: Údaje o analytických postupech stanovení aukubinu

| Zdroj | Metoda separace Kolona | Mobilní fáze | Detekce | Kalibrační data | Citace |
|---------------------------|--|---|----------------------------|---|--------|
| Jitrocel kopinatý (listy) | HPLC: C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) | A: Orthofosforečná kyselina 1 % (v/v voda) B: ACN (gradient. eluce) | UV/VIS– DAD (210 nm) | $y = 1583,1x + 9,0$ $r > 0.9995$ LOD = 16.06 µg/ml LOQ = 53.33 µg/ml | [56] |
| Jitrocel kopinatý (listy) | HPLC: C18 (100 nm x 6 nm, 3 µm) ODS-A | 1 % ACN (izokratická eluce) | UV/VIS– DAD (204 nm) | $r^2 > 0,989$ recovery > 99,3 % | [60] |
| Rehmánie lepkavá (listy) | HPLC: C18 (100 mm x 4.6 mm, 2.6 µm) | ACN: H ₂ O (5:95) | UV/VIS– DAD (210 nm) | $y = 0.9952x + 6.8458$ $r^2 = 0,9999$ | [61] |
| Jitrocel kopinatý | HPLC: C18 (100 nm x 6 nm) | 1 % ACN | UV/VIS– DAD (240 nm) | | [22] |
| Pivoňka mléčnokvětá | HPLC: C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) | A: vodný roztok 20mM KH ₂ PO ₄ B: 100 % ACN | UV/VIS-PDA (210 nm) | | [65] |
| Jitrocel kopinatý (listy) | LC-MS: C18 (50 mm x 4.6, 1.8 µm) | A: 1 % HCOOH B: metanol | MS (atomová spektrometrie) | | [56] |

| | | | | | |
|---------------------------------|-------|--|----|--|------|
| Jitrocel kopinatý (listy) | LC-MS | A: ACN B: H ₂ O (gradient. eluce) | MS | | [20] |
|---------------------------------|-------|--|----|--|------|

Ve všech zmíněných studiích se shodoval výběr kolony, kdy nejúčinnější byla kolona C₁₈, lišící se pouze v jednotlivých studiích svými rozměry.

Mobilní fáze se ve studiích uvedených v **Tab. č. 5** lišila jak složením, tak způsobem eluce. Nejčastěji byla využívána mobilní fáze ve formě různě koncentrovaného vodného roztoku acetonitrilu. Jako vhodnější se prokázalo použití roztoku acetonitrilu s koncentrací nižší než 5 %, protože nedocházelo k interferencím s čarou pro rozpouštědlo metanol. Jak je uvedeno ve studii Wang a spol. (2016), analytická čára pro aukubin v oblasti píku vykazovala v případě izokratické eluce ze začátku hladší průběh, oproti eluci gradientní, proto byla izokratická eluce považována za vhodnější.

Ke stanovení aukubinu byly využívány různé analytické čáry o vlnových délkách v rozmezí 204–240 nm. Za nejvhodnější byla považována vlnová délka 210 nm. Při nižší hodnotě vlnové délky by mohlo dojít k nežádoucím interferencím s čarou metanolu, který byl použit jako rozpouštědlo (absorbuje záření UV-VIS detektoru při podobné vlnové délce jako aukubin (okolo 200 nm)). Naopak vyšší hodnota vlnové délky by způsobila špatné oddělení píku pro aukubin a píků ostatních analytů přítomných v jitroceli. [20] [22] [56] [61] [65]

1.14. Skladování vzorků jitrocele

O uchování vzorků jitrocele nebyly konkrétní odborné články doposud publikovány, avšak existuje řada publikací, ve kterých je zmiňováno uchování vysušených listů (v tomto případě *Eucommia ulmoides*) obsahujících aukubin. Články se shodují hlavně v tom, že vzorky obsahující aukubin je nutné skladovat v suchu a ve tmě. [66] [67] [26] [68]

Jak je zmíněno výše, čím nižší teplota, tím byla degradace aukubinu pomalejší. Studie popisují uchování suchých vzorků především při pokojové teplotě. [69] V jedné studii byly vzorky skladovány při nižší než pokojové teplotě, a to při 5 °C. [70]

Sušené listy mohou být po absorpci určitého množství vody vhodným prostředím pro mikrobiální proliferaci. V rostlinných vzorcích byla zjištěna přítomnost velkého množství běžně se vyskytujících druhů hub, jako jsou například plísně z rodu *Aspergillus*. Tyto plísně

jsou schopné produkovat enzymy (především β -glykosidázu), které ovlivňují stabilitu některých bioaktivních látek, včetně aukubinu.

Ve studii Gonda a spol. (2012) byl sledován vliv relativní vlhkosti na proliferaci 10 odlišných kolonií hub, které byly izolovány z vysušených listů jitrocele, a následného vlivu těchto hub na degradaci aukubinu. 7 z 10 izolovaných kolonií ovlivňovalo degradaci aukubinu. Při relativní vlhkosti 75 % došlo přibližně po 10 týdnech k nárůstu těchto kolonií o 3–4 řády. To mělo za následek zvýšení množství enzymů, jež působily na látky ve vzorcích. Po 24 týdnech byl při relativní vlhkosti 75 % aukubin již z 95,7 % degradován. V případě vystavení vzorků relativní vlhkosti 45 %, se množství fungálních kolonií prakticky nelišilo, oproti kontrolní skupině vzorků (0 % vlhkost). Degradace aukubinu proběhla po 24 týdnech v tomto případě pouze ze 4,5 %.

Z výsledků lze usuzovat, že samotná vlhkost nemá na degradaci aukubinu vliv (nebo má minimální), avšak vodné prostředí poskytuje vhodné podmínky pro nárůst fungálních kmenů, které nepřímo ovlivňují degradaci aukubinu.

Aby se zamezilo vlivu vlhkosti na vysušené vzorky, a tím pádem se zamezilo mikrobiální proliferaci, doporučuje se uchovávat vzorky v suchu, nejlépe v nádobách bez přístupu vzduchu. Spolehlivým upozorněním na působení vody na vzorky je jejich zhnědnutí. Změna barvy však byla pozorována až při vystavení vzorků 75 % relativní vlhkosti. [71] [72]

Ve studii Tamura a spol. (2012) byla sledována stabilita aukubinu v metanolovém extraktu, kdy proběhly stanovení koncentrací aukubinu ve vzorcích v intervalech 0, 2, 4, 8, 12, 16, 24 hodin po extrakci. Relativní směrodatná odchylka byla po 24 hodinách 2,38 %, z čehož lze usuzovat, že je aukubin v metanolu minimálně po dobu 24 hodin relativně stabilní.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Vzorky

Reálné vzorky jitrocele byly dodány firmou Plavnická s.r.o. z Březí u Českých Budějovic. Jednalo se o granule a sušenou sypanou směs řezaných nadzemních částí rostlin. Dodané granule byly dvojího druhu: jitrocel list a jitrocel nať. Listy jitrocele k výrobě granulí byly sesbírány v září 2020, nať byla sečena na začátku srpna 2020.

Analytický standard Aukubinu pro HPLC v čistotě ≥ 98 % a hmotnosti 5 mg byl zakoupen od firmy Merck (CAS-479-98-1). Práškový standard byl dodán ve skleněné ampuli se zataveným dnem. Při manipulaci se standardem byly dodrženy veškeré pokyny dodavatele.[73]

2.2. Příprava vzorků k analýze

Reálné vzorky jitrocele bylo nejprve nutné zhomogenizovat. Homogenizace probíhala pomocí kryogenního mletí v prostředí kapalného dusíku. K danému účelu bylo využito zařízení Freezer/Mill 6775 od firmy SPEX. [74] Navážka zpracovávaného suchého rostlinného materiálu se pohybovala v rozmezí 1 až 4 g a byla volena tak, aby daný materiál zaujímal mezi 1/3 a 1/2 objemu pracovní nádoby mlýnu. Parametry mletí byly zvoleny na základě zkušeností školícího pracoviště se zpracováním podobných typů vzorků. Pracovní program kryogenního mlýnu vypadal následovně: doba chlazení před zahájením mletí – 25 minut, doba mletí – 1 minuta, doba chlazení mezi jednotlivými mlecími cykly – 2 minuty, počet mlecích cyklů – 3 a frekvence pohybu mlecího tělesa – 10 Hz.

Práškové vzorky získané kryogenním mletím výchozího rostlinného materiálu byly následně podrobeny extrakci. $100 \pm 0,2$ mg každého vzorku bylo smícháno s 10 ml metanolu (koncentrace $>99,9$ %). Vzorky byly umístěny do třepačky (Heidolph-Vibramax 100) a třepány po dobu 2 hodin při pokojové teplotě, za normálního tlaku a otáček 300 rpm. Získané směsi byly přefiltrovány do Erlenmayerových baněk přes kvalitativní papírový filtr KA 4 (průměr 110 mm, Papírna Pernštejn Keseg & Rathouzský). Filtrát byl převeden do kádinky, ze které byl odfiltrován přes stříkačkový filtr (velikost pórů: 1 μm , Minisart[®] Syringe Filter-Sartorius) do

odměrné baňky. Vzorky byly takto uloženy do lednice, kde byly až do samotné analýzy ponechány.

Pro kalibraci HPLC byl z analytického práškového standardu od firmy Merck připraven standardní roztok aukubinu o koncentraci 0,2 mg/ml.

Poté byly připraveny 2 roztoky o koncentraci 0,04 mg/ml k přípravě kalibrační řady. Ze standardního roztoku bylo odpipetováno 2×5 ml do 25 ml odměrných baněk. Z jedné 25 ml baňky byly pak následně rozředěny jednotlivé kalibrační roztoky, které po smíchání s demi vodou měly koncentrace 0,04; 0,02; 0,01; 0,005; 0,0025; 0,00125 mg/ml.

2.3. Optimalizace parametrů HPLC pro stanovení aukubinu

Při výběru optimalizačních kritérií a postupu optimalizace jsem vycházela z práce Wang a spol. (2016). [61]

Ke stanovení aukubinu byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie na přístroji Agilent 1260 Infinity II Prime LC System, s vyhodnocením na DAD detektoru (1260 Infinity II Diode Array Detector WR). V rámci optimalizace HPLC metody byl sledován vliv složení mobilní fáze, průtoku mobilní fáze kolonou, objemu nástřiku a teploty na hodnotu retenčního času (RČ) a na tvar, výšku a plochu píku pro aukubin. Kromě vizuálního hodnocení tvaru píku byly sledovány i objektivní parametry jako faktor asymetrie a tailing faktor.

Analytická čára použitá pro stanovení aukubinu měla vlnovou délku 210 nm. Tato čára byla zvolena v souladu s prací Janković a spol. (2010) kde se uvádí, že intenzivnější čára aukubinu o vlnové délce okolo 200 nm interferuje s čarou metanolu, který byl v našem případě použit jako rozpouštědlo. [56]

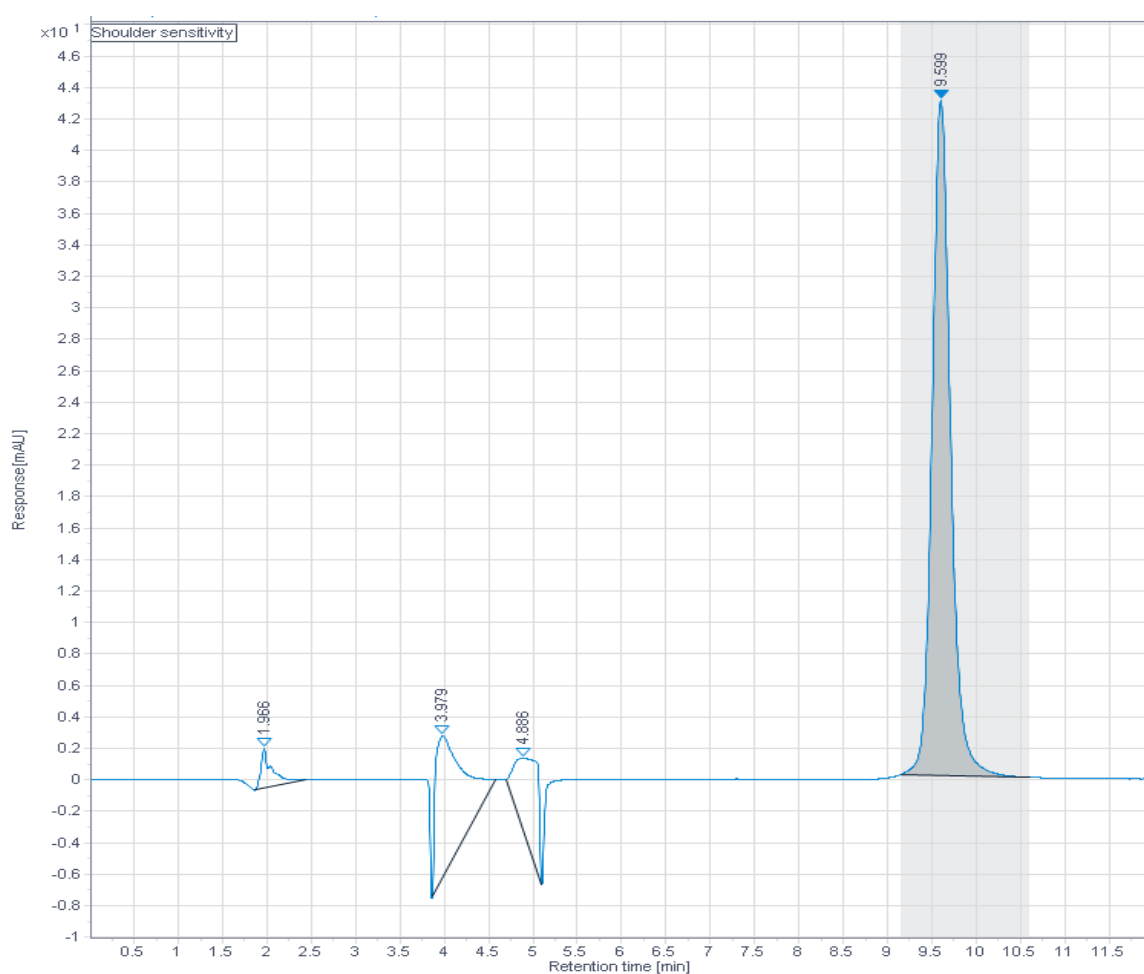
2.4. Optimalizované parametry HPLC

Optimalizace podmínek pro kapalinovou chromatografii byla prováděna s využitím nejkoncentrovanějšího kalibračního roztoku aukubinu o koncentraci 0,04 mg/ml.

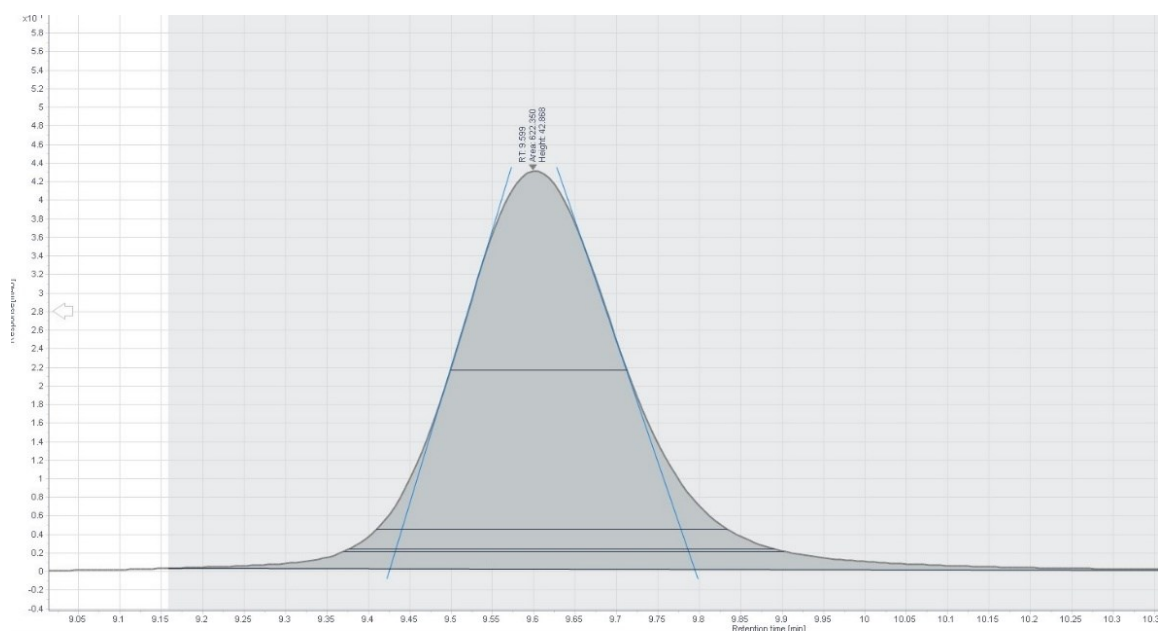
Na základě údajů ze studie Wang a spol. (2016) byl jako mobilní fáze zvolen systém acetonitril (ACN)–voda. [61] Tento systém by měl teoreticky zajistit lepší rozlišení analytických čar, než systém metanol–voda. Byly testovány následující poměry směsi H₂O: ACN - 90:10, 95:5, 94:6, 93:7.

Průtok mobilní fáze kolonou byl postupně nastaven na hodnoty 0,6; 0,8 a 0,1 ml/min. Sledován byl také vliv objemu nástřiku, a to pro hodnoty 10 μ L a 20 μ L. Vliv teploty na retenční čas byl sledován při 25 a 30 $^{\circ}$ C.

Na **Obr. č. 5** je zobrazen chromatogram okolí zvolené analytické čáry aukubinu, která je zvýrazněna. Izokratická mobilní fáze v daném případě obsahovala 4 % acetonitrilu v 96 % procentech vody a byla do kolony vyhřátá na teplotu 30 $^{\circ}$ C dávkována rychlostí 0,6 ml/min. Objem nástřiku vzorku byl 20 μ L. Aukubin byl stanovován při vlnové délce λ 210 nm. Retenční čas byl pro detekci standardu aukubinu za těchto podmínek naměřen 9,6 minut.



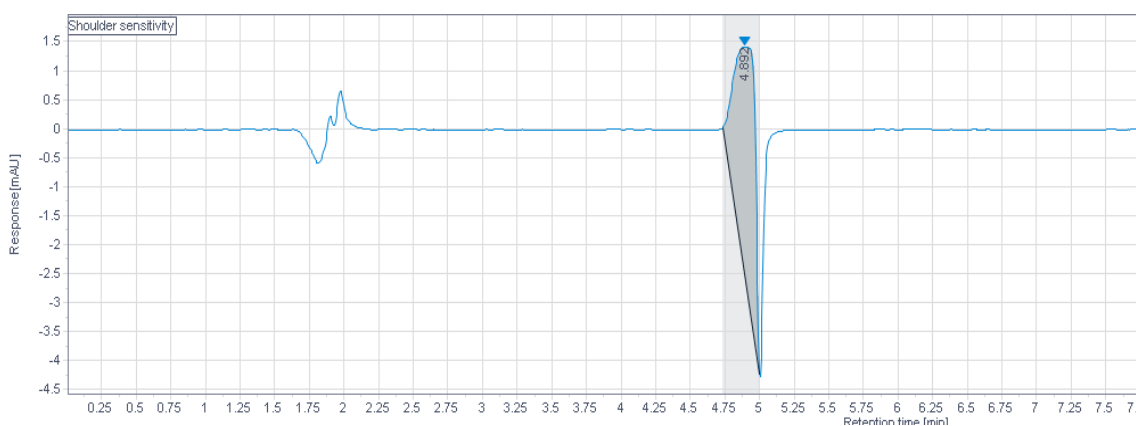
Obrázek č. 5: HPLC-UV chromatogram standardu aukubinu v okolí vlnové délky 210 nm



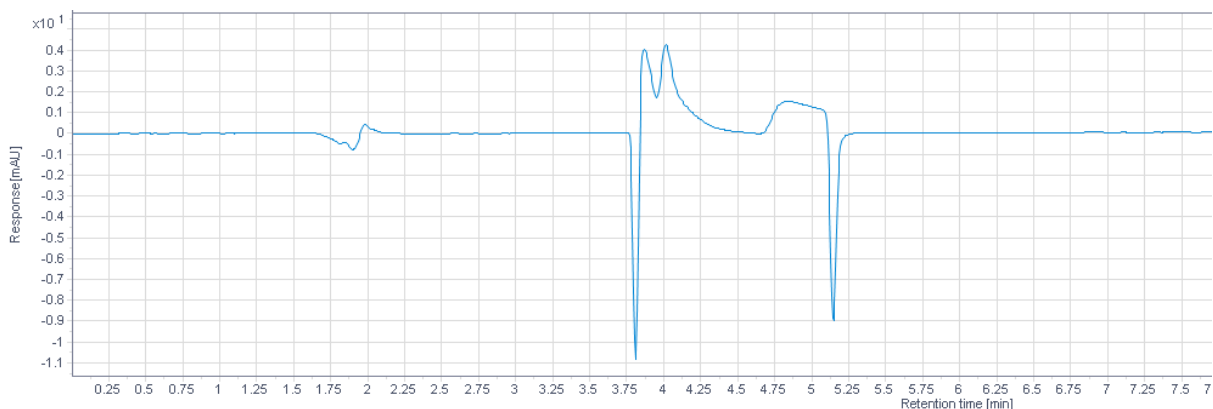
Obrázek č. 6: Detail analytické čáry aukubinu

Bylo nutné detekovat analytické čáry, které se zobrazují v chromatogramu pro demi vodu a také určit analytickou čáru pro rozpouštědlo, metanol. Jak je zřejmé z **Obr. č. 7**, okolo 1,7 minuty a 4,8 minuty se na chromatogramu čisté demi vody zobrazuje analytická čára, pravděpodobně příslušící nečistotám, vyskytujícím se v demi vodě.

Analytická čára pro metanol byla za výše uvedených podmínek stanovena v čase kolem 3,75 minuty, jak je zobrazeno na **Obr. č. 8**.



Obrázek č. 7: HPLC-UV chromatogram demi vody v okolí vlnové délky 210 nm



Obrázek č. 8: HPLC-UV chromatogram demi vody a metanolu v okolí vlnové délky 210 nm

2.5. Kalibrační závislost

Po proměření řady kalibračních standardů byla sestrojena závislost intenzity analytické čáry vyjádřené jako plocha píku (mAu.s) na koncentraci analytu v kalibračním standardu (mg/ml). Intenzita analytické čáry byla vypočtena jako aritmetický průměr ze tří opakovaných měření daného standardního roztoku. K sestrojení kalibrační křivky byl využit modul lineární regrese v programu Microsoft Excel – verze 2105.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Postup optimalizace podmínek HPLC je detailně popsán v kapitole 2.4. Vliv složení mobilní fáze při různých objemech dávkování a stabilní hodnotě průtoku (0,8 mL/min) a teploty (25 °C) na retenční čas, intenzitu analytické čáry a její kvalitativní parametry je shrnut v **Tab. č. 6**.

Tabulka 6: Vliv složení mobilní fáze a objemu nástřiku na parametry analytické čáry aukubinu při teplotě 25 °C a průtoku 0,8 ml/min

| ACN | Dávkování (μL) | Retenční čas (min) | Plocha píku | Výška píku | Faktor Asymetrie | Tailing faktor |
|------|----------------|--------------------|-------------|------------|------------------|----------------|
| 10 % | 10 | 3,5 | 254 | 61 | 1,12 | 0,89 |
| 10 % | 20 | 3,5 | 424 | 132 | 1,02 | 1,06 |
| 5 % | 10 | 6,2 | 236 | 24 | 1,09 | 1,13 |
| 5 % | 20 | 6,2 | 468 | 46 | 1,13 | 1,15 |
| 3 % | 10 | 10,4 | 232 | 15 | 1,09 | 1,14 |
| 3 % | 20 | 10,4 | 463 | 73 | 1,07 | 1,11 |

Jak je z údajů v **Tab. č. 6** zřejmé, při použití mobilní fáze 10 % ACN a 90 % vody byl naměřený retenční čas pro detekci aukubinu natolik krátký, že došlo k překryvu analytických čar pro aukubin a rozpouštědlo (metanol – RČ 3,75 min). Z daného důvodu byla mobilní fáze tohoto složení z dalších experimentů vyloučena.

Pro mobilní fázi se 3 a 5 % ACN už byl retenční čas píku aukubinu delší, což zvýšilo odstup zmíněných píků, a tedy rozlišení metody. Při použití mobilní fáze s 5 % ACN vykazoval pík aukubinu mírný „front tailing“, což dokazuje i hodnota $T_f = 1,15$ ($T_f > 1$) v **Tab. č. 6**. Tato nesymetričnost nebyla nijak výrazná, ale při použití mobilní fáze se 3 % ACN tento jev nebyl zaznamenán vůbec. Mobilní fáze se 3 % ACN poskytovala nejdelší retenční čas, což na jedné straně mohlo být nevýhodné z hlediska rychlosti analýzy, ale na druhou stranu se dala předpokládat výhoda většího rozlišení při analýze reálných vzorků.

Teplota ovlivňovala retenční časy více než objem nástřiku. Přehled jednotlivých retenčních časů při rozdílném složení mobilní fáze za teploty 25 °C a 30 °C je shrnut v **Tab. č. 7**.

Tabulka 7: *Vliv teploty a složení mobilní fáze na retenční čas analytické čáry aukubinu*

| Teplota (°C) | Mobilní fáze – ACN (%) | Retenční čas (min) |
|--------------|------------------------|--------------------|
| 25 | 3 | 10,4 |
| 25 | 5 | 6,2 |
| 30 | 3 | 9,7 |
| 30 | 5 | 5,9 |

Z výsledků prezentovaných v **Tab. č. 7** lze usuzovat, že s rostoucí teplotou se zkracoval retenční čas aukubinu. Proto byla pro další měření zvolena teplota 30 °C.

Následně byl sledován vliv průtoku mobilní fáze přes kolonu na retenční čas. **Tab. č. 8** porovnává retenční čas pro aukubin za rozdílných průtoků pro koncentrace 3 % a 5 % ACN.

Tabulka 8: *Vliv průtoku a složení mobilní fáze na retenční čas analytické čáry aukubinu*

| Průtok (ml/min) | Mobilní fáze – ACN (%) | Retenční čas (min) | Plocha píku | Výška píku |
|-----------------|------------------------|--------------------|-------------|------------|
| 0,6 | 3 | 12,6 | 621 | 32 |
| 0,6 | 5 | 7,8 | 626 | 53 |
| 0,8 | 3 | 9,7 | 466 | 30 |
| 0,8 | 5 | 5,9 | 468 | 49 |
| 1 | 3 | 7,7 | 375 | 28 |
| 1 | 5 | 4,8 | 375 | 45 |

Zajímavé bylo porovnání analytických čar pro 3 % ACN při průtoku 1 ml/min a při použití 5 % ACN při průtoku 0,6 ml/min. Zjištěné hodnoty retenčního času pro aukubin byly podobné (7,684 minut a 7,819 minut), ale plochy píků se lišily téměř o polovinu.

Tabulka 9: *Srovnání vlivu průtoků a složení mobilní fáze na retenčním času analytické čáry aukubinu*

| Průtok (ml/min) | Mobilní fáze ACN (%) | Retenční čas (min) | Plocha píku | Výška píku | Faktor asymetrie | Tailing faktor |
|-----------------|----------------------|--------------------|-------------|------------|------------------|----------------|
| 1 | 3 | 7,7 | 375 | 28 | 1,08 | 1,12 |
| 0,6 | 5 | 7,8 | 626 | 53 | 1,14 | 1,20 |

Analytická čára získaná při použití mobilní fáze s 5 % ACN vykazovala vyšší hodnotu tailing faktoru, což se v chromatogramu projeví jako větší „front tailing“. Měla ale téměř dvojnásobnou plochu, než čára získaná s využitím mobilní fáze se 3 % ACN. Zdá se tedy, že by ideálního poměru mezi tvarem a plochou píku mohlo být dosaženo s využitím mobilní fáze

obsahující 4 % ACN. Parametry analytické čáry získané s využitím této mobilní fáze jsou shrnuty v **Tab. č. 10**.

Tabulka 10: Analytické údaje pro aukubin při použití 4 % acetonitrilu, průtoku 0,6 ml/min, teplotě 30 °C a dávce 20 µL

| Retenční čas (min) | Plocha píku | Výška píku | Faktor Asymetrie | Tailing faktor |
|--------------------|-------------|------------|------------------|----------------|
| 9,6 | 622 | 42 | 1,12 | 1,16 |

Z výsledků v **Tab č. 10** je patrné, že při použití 4 % acetonitrilu s průtokem 0,6 ml/min je dosaženo ideálního poměru mezi plochou a tvarem píku. Plocha píku téměř odpovídala hodnotě plochy píku při použití 5 % ACN, a naopak tailing faktor se blížil k hodnotě tailing faktoru pro 3 % ACN.

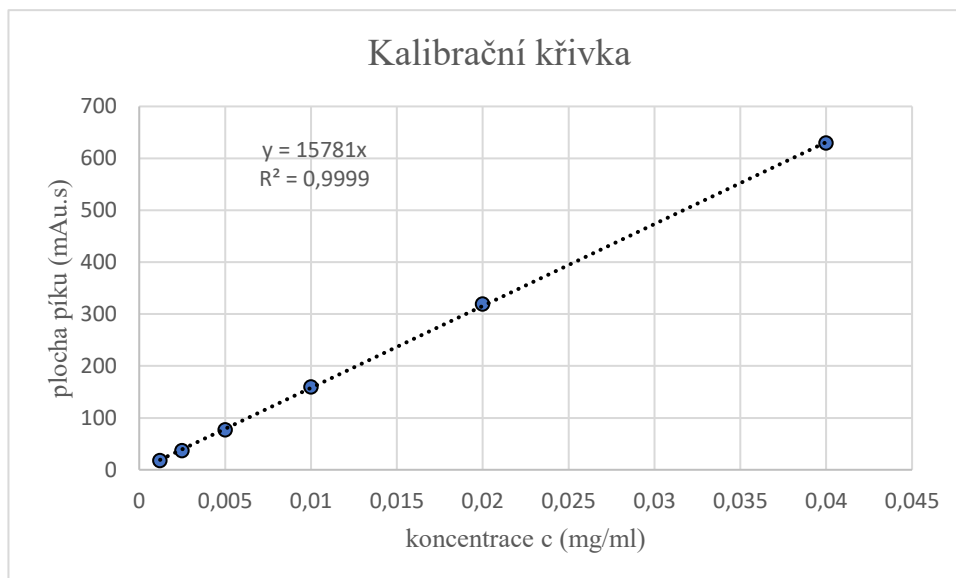
Měření bylo následně za těchto podmínek zopakováno, aby se prokázalo, že je metoda reprodukovatelná.

3.1. Kalibrace

Postup přípravy kalibračních roztoků je uveden v kapitole 2.2. V **Tab. č. 11**, jsou uvedeny hodnoty ploch píků pro jednotlivé koncentrace. Je zde uvedena výsledná průměrná hodnot ploch píků třech měření. Na **Obr. č. 9** je zobrazen graf příslušné kalibrační závislosti koncentrace na ploše píku.

Tabulka 11: Závislost koncentrace kalibračního roztoku aukubinu na průměrné ploše píku

| | | | | | | |
|-------------------------|---------|--------|-------|------|------|------|
| c (mg/ml) | 0,00122 | 0,0025 | 0,005 | 0,01 | 0,02 | 0,04 |
| Průměrná hodnota plochy | 17 | 37 | 78 | 159 | 319 | 630 |



Obrázek č. 9: Graf zobrazující kalibrační křivku závislosti plochy píku na koncentraci aukubinu (mg/ml)

Z grafického znázornění kalibrační křivky vyplývá, že se zvyšující se koncentrací roztoku aukubinu, roste plocha píku téměř lineárně.

Následně bylo ještě nutné ověřit, že je roztok s nejnižší koncentrací aukubinu nad detekčním limitem. Byl proměřen šum na blanku v čase od 8,5–10 minuty (v rozmezí odpovídající píku pro aukubin). Plocha píku by měla být vyšší než desetinásobek šumu. Šum byl naměřen 0,11. Nejnižší plocha byla naměřena u vzorku s koncentrací 0,00125 mg/ml a to 17,46. Podmínka limitu detekce byla splněna.

3.2. Reálné vzorky

Jednotlivé vzorky byly označeny následovně: sušené řezané nadzemní části rostlin – 1 a 2; granule z listů (září 2020 seč – prosinec 2020 granulace) – A–D; a granule z nati (10.8. 2020 seč a 15. 9. 2020 granulace) – I–IV.

Vzorky připravené po homogenizaci a extrakci byly odebrány z lednice a doplněny v 10 ml odměrných baňkách po rysku. Poté bylo odpipetováno 1,5 ml do vialek, které byly vloženy do chromatografu, kde byla spuštěna analýza. Výsledky uvádí **Tab. č. 12, 13 a 14**.

U všech použitých vzorků, nebyl záznam analytické čáry v oblasti pro aukubin úplně symetrický. U většiny vzorků vykazoval tvar píku tzv. „front tailing“, který mohl být zapříčiněn vlivem matrice těchto vzorků.

Tabulka 12: Změřené analytické údaje pro reálné vzorky – řezanka

| vzorek | RČ (min) | Plocha | Výška | Asymetrie | Tailing faktor | Šum | c AU v extraktu (mg/ml) | Obsah v sušině (%) |
|--------|----------|--------|-------|-----------|----------------|------|-------------------------|--------------------|
| 1 | 9,6 | 75 | 5 | 1,07 | 1,08 | 1,01 | 0,2374 | 0,24 |
| 2 | 9,6 | 49 | 3 | 1,21 | 1,30 | 0,39 | 0,1551 | 0,15 |

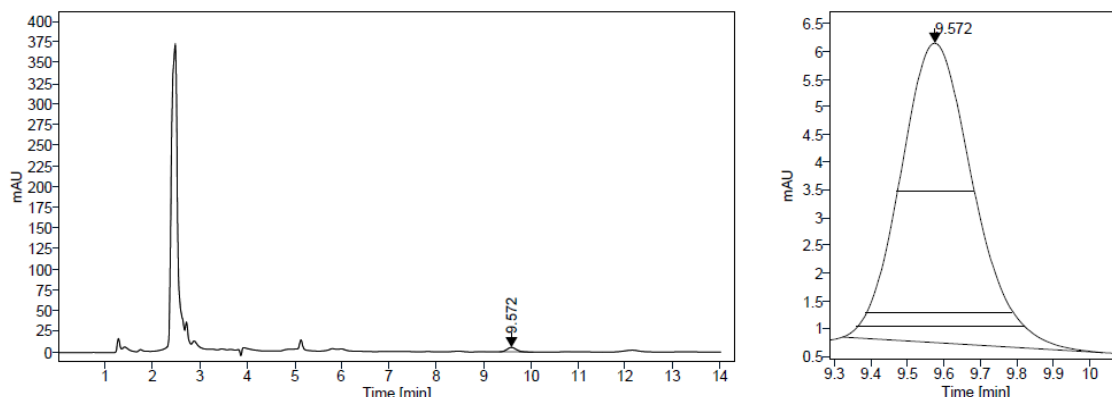
Tabulka 13: Změřené analytické údaje pro reálné vzorky – jitrocel listy (granule)

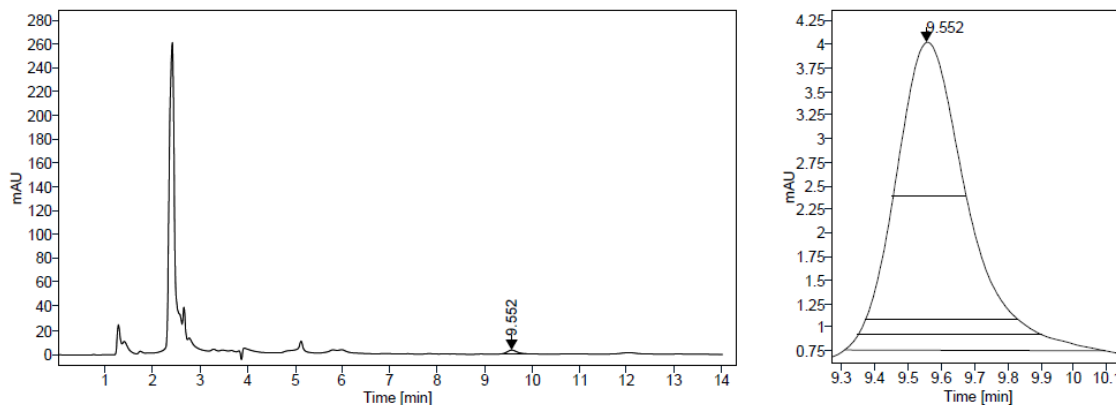
| vzorek | RČ (min) | Plocha | Výška | Asymetrie | Tailing faktor | Šum | c AU v extraktu (mg/ml) | Obsah v sušině (%) |
|--------|----------|--------|-------|-----------|----------------|------|-------------------------|--------------------|
| A | 9,6 | 358 | 24 | 1,10 | 1,13 | 1,27 | 1,1342 | 1,13 |
| B | 9,6 | 349 | 23 | 1,09 | 1,05 | 1,73 | 1,1044 | 1,1 |
| C | 9,6 | 286 | 21 | 1,09 | 1,10 | 1,11 | 0,9050 | 0,91 |
| D | 9,6 | 340 | 23 | 1,11 | 1,11 | 1,82 | 1,0765 | 1,08 |

Tabulka 14: Změřené analytické údaje pro reálné vzorky – jitrocel nať (granule)

| vzorek | RČ (min) | Plocha | Výška | Asymetrie | Tailing faktor | Šum | c AU v extraktu (mg/ml) | Obsah v sušině (%) |
|--------|----------|--------|-------|-----------|----------------|------|-------------------------|--------------------|
| I | 9,6 | 24 | 2 | 0,94 | 0,97 | 0,52 | 0,0759 | 0,08 |
| II | 9,6 | 29 | 2 | 0,96 | 1,02 | 0,30 | 0,0903 | 0,09 |
| III | 9,6 | 28 | 2 | 0,97 | 1,02 | 0,32 | 0,0872 | 0,09 |
| IV | 9,6 | 29 | 2 | 0,97 | 1,03 | 0,27 | 0,0907 | 0,09 |

Pík pro aukubin byl detekován na základě zjištěného retenčního času, který byl naměřen pro analytickou čáru standardního roztoku aukubinu. V **Tab. č. 12** jsou uvedeny naměřená analytická data pro vzorek řezanky. Výsledné hodnoty obsahu aukubinu v suchém vzorku byly 0,24 hm% a 0,15 hm%. Obsah aukubinu je oproti údajům z literatury nižší, na což mohlo mít vliv mimo jiné složení vzorku (listy, stonky) a technologické zpracování (doba a způsob sklizně).

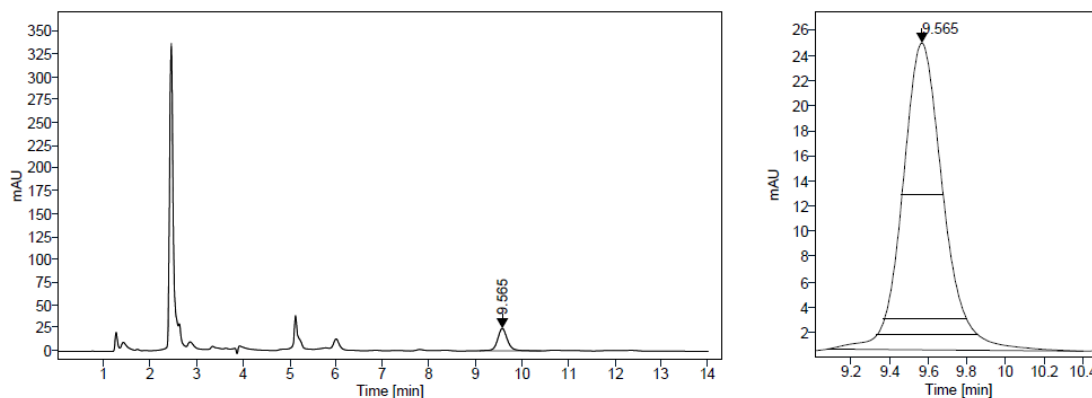
**Obrázek č. 10:** Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek 1 – jitrocel řezanka



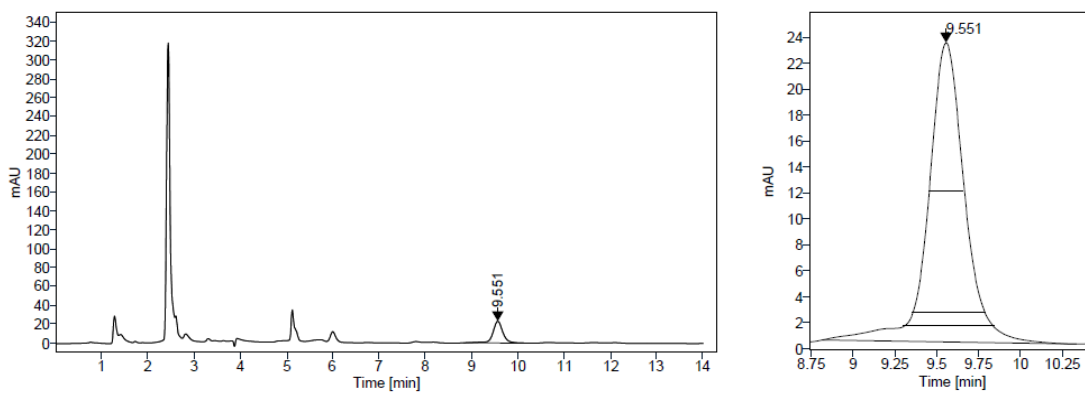
Obrázek č. 11: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek 2 – jitröcel řezanka

U vzorků granulovaných sušených listů označených A–D byla průměrná hodnota ploch píků 333 ± 24 . Analytický proces byl v případě granulovaných vzorků listů reprodukovatelný. Velikost směrodatné odchylky byla pravděpodobně spojena s homogenitou vzorkování.

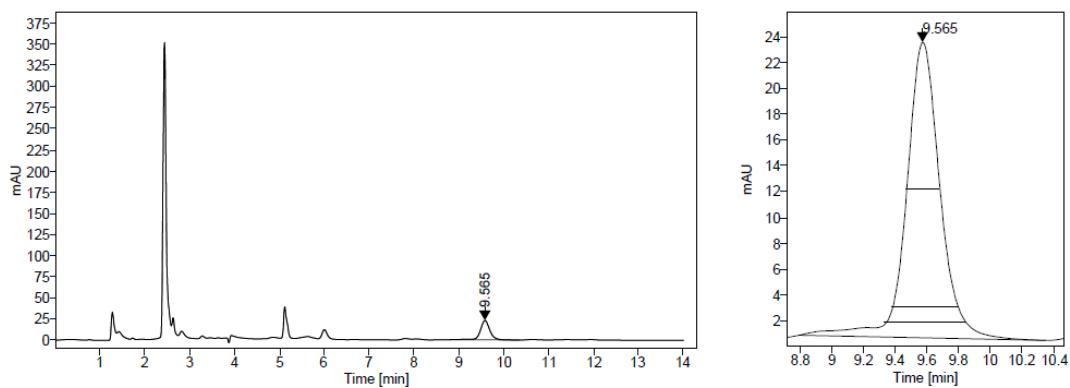
Průměrný obsah aukubinu v granulích listů jitröcele byl naměřen 1,06 hm%. V granulích z nati jitröcele byla průměrná hodnota obsahu nižší a to pouze 0,09 hm %. V listech jitröcele byla detekována vyšší koncentrace aukubinu než v nati jitröcele, jak také uvádí literatura. Celkově nízká střední hodnota zjištěných koncentrací v granulích listů a nati může poukazovat na vliv doby, způsobu sklizně a zpracování vzorků, ale i na problém v analytickém procesu.



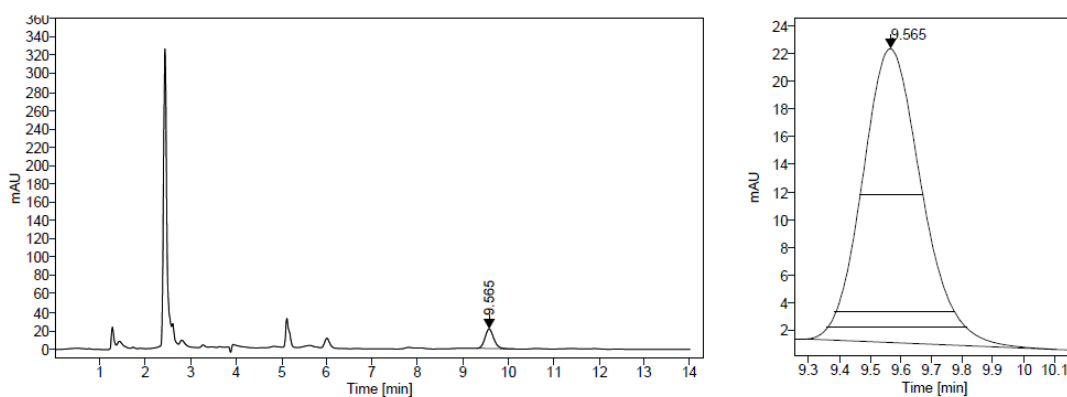
Obrázek č. 12: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek A – jitröcel listy



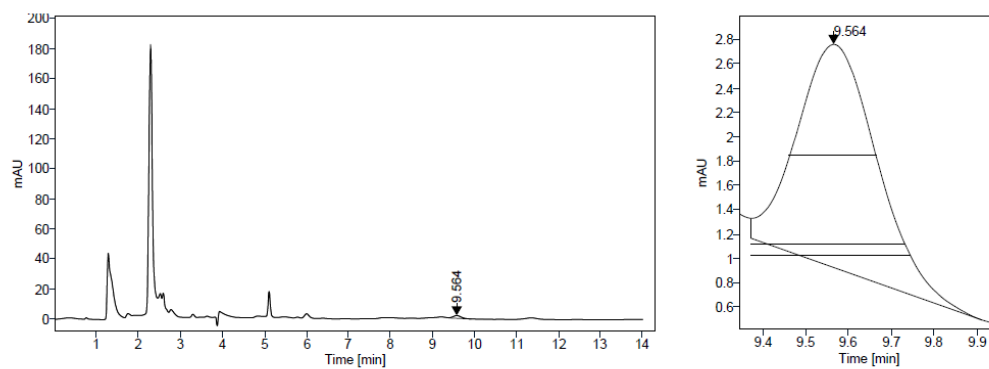
Obrázek č. 15: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek B – jitrocel listy



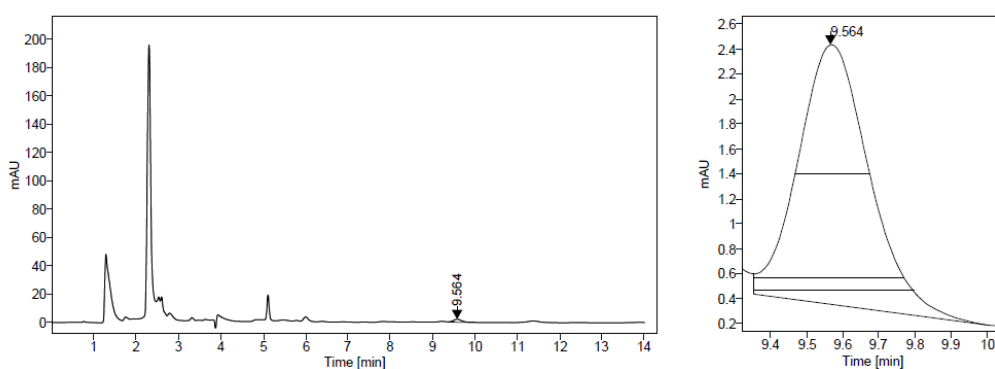
Obrázek č. 13: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek C – jitrocel listy



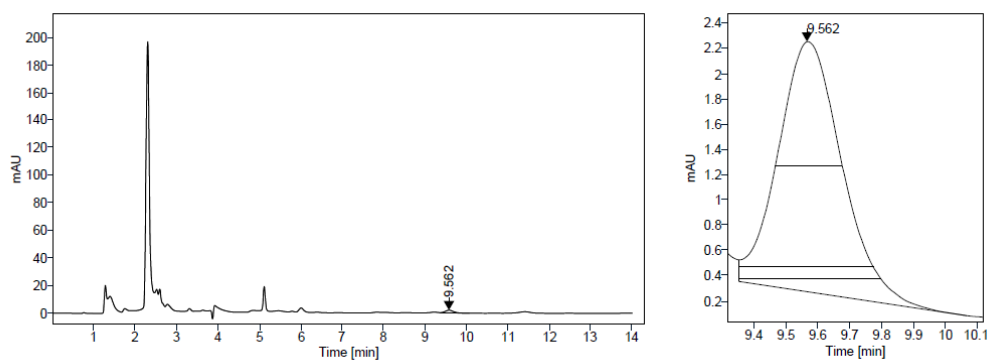
Obrázek č. 14: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek D – jitrocel listy



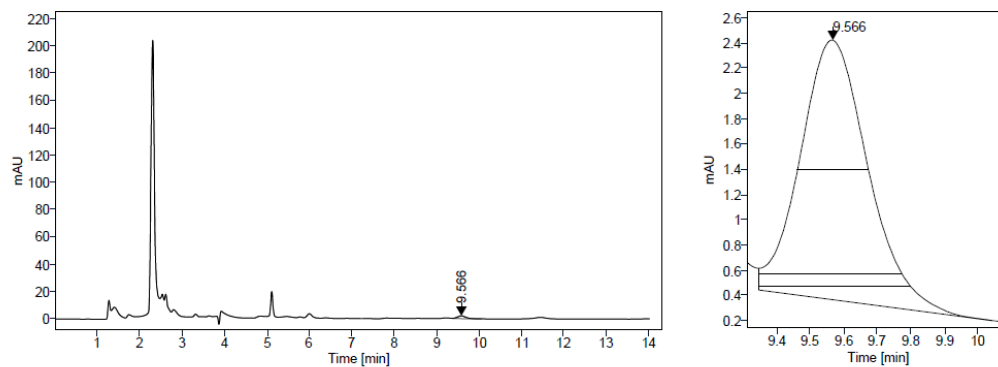
Obrázek č. 16: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek I – jitrocel nat'



Obrázek č. 17: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek II – jitrocel nat'



Obrázek č. 18: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek III – jitrocel nat'



Obrázek č. 19: Analytická čára aukubinu (okolí vlnové délky 210 nm), vzorek IV – jitrocel nat'

ZÁVĚR

V rámci literární rešerše jsem nejprve stručně popsala rod jitrocel a čeleď jitrocelovité. Poté jsem se zaměřila na bioaktivní sloučeniny obsažené v jitroceli, kdy jsem detailně rozebírala jejich farmakokinetické vlastnosti, ale i jejich mechanismus účinku na tkáňové a orgánové úrovni.

V další části jsem zpracovala analytické postupy zpracování vzorku a také vhodné analytické metody ke stanovení aukubinu v jitroceli. Údaje z literárních rešerší jsem využila pro návrh postupu optimalizace metody pro stanovení aukubinu ve vzorcích jitrocele.

V rámci experimentální části jsem optimalizovala následující podmínky vysokoúčinné kapalinové chromatografie: složení mobilní fáze, její průtok kolonou, teplotu kolony a nástřik vzorku.

Optimální metoda pak měla tyto parametry: složení mobilní fáze 4 % ACN, průtok mobilní fáze kolonou 0,6 ml/min, teplota kolony 30 °C, objem nástřiku 20 µl.

Při analýze reálných vzorků byla pozorována deformace analytické čáry (front tailing) a výsledné koncentrace aukubinu stanovené v těchto vzorcích byly nižší, než je zmiňováno v literatuře. Oba popsané jevy ukazují na možné matriční jevy a navrženou metodiku by bylo třeba dále optimalizovat, ať už z pohledu parametrů HPLC techniky či kalibračního přístupu (např. metoda standardního přídatku). Bohužel, kvůli pandemii COVID – 19 nebylo možné další postupy zkusit a ověřit.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] XU, Zhenghao a Le CHANG. Plantaginaceae. In: *Identification and Control of Common Weeds: Volume 3*. B.m.: Springer, 2017, s. 339–374.
- [2] RØNSTED, Nina, Edith GÖBEL, Henrik FRANZYK, Søren Rosendal JENSEN a Carl Erik OLSEN. Chemotaxonomy of Plantago. Iridoid glucosides and caffeoyl phenylethanoid glycosides. *Phytochemistry*. 2000, **55**(4), 337–348.
- [3] STEWART, A. V. Plantain (*Plantago lanceolata*)-a potential pasture species. In: *Proceedings of the Conference-New Zealand Grassland Association*. 1996, s. 77–86. ISBN 0369-3902.
- [4] SAMUELSEN, Anne Berit. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of ethnopharmacology*. 2000, **71**(1–2), 1–21.
- [5] ADOM, Muhammad Bahrain, Muhammad TAHER, Muhammad Fathiy MUTALABISIN, Mohamad Shahreen AMRI, Muhammad Badri Abdul KUDOS, Mohd Wan Azizi Wan SULAIMAN, Pinaki SENGUPTA a Deny SUSANTI. Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017, **96**, 348–360.
- [6] *jitrocel kopinatý - Plantago lanceolata | Květena České republiky - plané rostliny ČR | www.kvetenacr.cz* | [online]. [vid. 2020-11-22]. Dostupné z: <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=21>
- [7] PRIMACK, Richard B. a Janis ANTONOVICS. Experimental ecological genetics in *Plantago*. V. Components of seed yield in the ribwort plantain *Plantago lanceolata* L. *Evolution*. 1981, 1069–1079.
- [8] *Přírodou.cz: Atlas rostlin: jitrocelovitě: jitrocel: jitrocel kopinatý* [online]. 18. prosinec 2009 [vid. 2020-11-20]. Dostupné z: <https://web.archive.org/web/20091218045810/http://rostliny.prirodou.cz/jitrocelovite/jitrocel/jitrocel-kopinaty/>
- [9] HADDADIAN, Kazhal, Katayoon HADDADIAN a Mohsen ZAHMATKASH. A review of *Plantago* plant. 2014.
- [10] *Flavones - an overview | ScienceDirect Topics* [online]. [vid. 2020-11-25]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/flavones>
- [11] VOLF, K. a F. ANDRS. Flavonoidy a jejich biologické působení. *JuWital sro, Praha*. 2008.
- [12] KAWASHTY, S. A., M. F. ABDALLA a N. A. M. SALEH. Flavonoids of *Plantago* species in Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1994, **22**(7), 729–733.
- [13] WANG, Han, Xiaoming ZHOU, Lingyun WU, Guangjie LIU, Weidong XU, Xiangsheng ZHANG, Yongyue GAO, Tao TAO, Yan ZHOU a Yue LU. Aucubin

- alleviates oxidative stress and inflammation via Nrf2-mediated signaling activity in experimental traumatic brain injury. 2020.
- [14] DALAR, Abdullah, Musa TÜRKER a Izabela KONCZAK. Antioxidant capacity and phenolic constituents of *Malva neglecta* Wallr. and *Plantago lanceolata* L. from Eastern Anatolia Region of Turkey. *Journal of Herbal Medicine*. 2012, **2**(2), 42–51.
- [15] RØNSTED, Nina, Henrik FRANZYK, Per MØLGAARD, Jerzy W. JAROSZEWSKI a Søren Rosendal JENSEN. Chemotaxonomy and evolution of *Plantago* L. *Plant Systematics and Evolution*. 2003, **242**(1), 63–82.
- [16] LEVELI, Levente, Eniko KOVACS, Maria-Alexandra HOAGHIA a Alexandru OZUNU. Accumulation of heavy metals in *Plantago major* grown in urban and post-industrial areas. *Studia Ubb Chemia*. 2018, **63**(1), 87–98.
- [17] BEKTESHI, Adem a Gezim BARA. Uptake of Heavy Metals from *Plantago major* in the Region of Durres, Albania. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2013, **22**, 1881–1885.
- [18] NADGÓRSKA-SOCHA, Aleksandra, Bartłomiej PTASIŃSKI a Andrzej KITA. Heavy metal bioaccumulation and antioxidative responses in *Cardaminopsis arenosa* and *Plantago lanceolata* leaves from metalliferous and non-metalliferous sites: a field study. *Ecotoxicology* [online]. 2013, **22**(9), 1422–1434. ISSN 1573-3017. Dostępne z: doi:10.1007/s10646-013-1129-y
- [19] GALAL, Tarek M. a Hanaa S. SHEHATA. Bioaccumulation and translocation of heavy metals by *Plantago major* L. grown in contaminated soils under the effect of traffic pollution. *Ecological Indicators* [online]. 2015, **48**, 244–251. ISSN 1470-160X. Dostępne z: doi:10.1016/j.ecolind.2014.08.013
- [20] HASAN, A. K., S. A. IBRAHIM, A. T. AMANI a F. M. MONTHER. Determination, isolation, and identification of aucubin and verbascoside in the leaves of Iraqi *Plantago lanceolata* L. using different detecting methods. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2018, **11**(2).
- [21] JURISIĆ, Renata, Željko DEBELJAK, Sanda VLADIMIR-KNEŽEVIĆ a Jadranka VUKOVIĆ. Determination of aucubin and catalpol in *Plantago* species by micellar electrokinetic chromatography. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2004, **59**(1–2), 27–31.
- [22] NAVARRETE, Soledad, Peter D. KEMP, Sarah J. PAIN a Penny J. BACK. Bioactive compounds, aucubin and acteoside, in plantain (*Plantago lanceolata* L.) and their effect on in vitro rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 2016, **222**, 158–167.
- [23] TRIM, A. R. a R. HILL. The preparation and properties of aucubin, asperuloside and some related glycosides. *Biochemical Journal*. 1952, **50**(3), 310–319.
- [24] GARDINER, Camilla A., Tim J. CLOUGH, Keith C. CAMERON, Hong J. DI, Grant R. EDWARDS a Cecile AM DE KLEIN. Potential inhibition of urine patch nitrous oxide emissions by *Plantago lanceolata* and its metabolite aucubin. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 2018, **61**(4), 495–503.

- [25] SERTIĆ, Miranda, Maja CRKVENČIĆ, Ana MORNAR, Kroata Hazler PILEPIĆ, Biljana NIGOVIĆ a Željko MALEŠ. Analysis of aucubin and catalpol content in different plant parts of four *Globularia* species. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2015, **88**(1).
- [26] ZENG, Xiangchang, Fei GUO a Dongsheng OUYANG. A review of the pharmacology and toxicology of aucubin. *Fitoterapia*. 2020, **140**, 104443.
- [27] ZHOU, Yong, Ping LI, Jia-Xi DUAN, Tian LIU, Xin-Xin GUAN, Wen-Xiu MEI, Yong-Ping LIU, Guo-Ying SUN, Li WAN a Wen-Jing ZHONG. Aucubin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in a mouse model. *Inflammation*. 2017, **40**(6), 2062–2073.
- [28] SUH, Nan-Joo, Chang-Koo SHIM, Min Hwa LEE, Shin Keun KIM a Il-Moo CHANG. Pharmacokinetic study of an iridoid glucoside: aucubin. *Pharmaceutical research*. 1991, **8**(8), 1059–1063.
- [29] HATTORI, Masao, Yukio KAWATA, Kazuyo INOUE, Yue-Zhong SHU, Qing-Ming CHE, Tsuneo NAMBA a Kyoichi KOBASHI. Transformation of aucubin to new pyridine monoterpene alkaloids, aucubinines A and B, by human intestinal bacteria. *Phytotherapy Research*. 1990, **4**(2), 66–70.
- [30] CHUN, In-Koo a Young-Mee CHO. Influence of pH, temperature, ionic strength and metal ions on the degradation of an iridoid glucoside, aucubin, in buffered aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 1995, **25**(3), 239–247.
- [31] MAFUD, Ana C., Marcos P. N. SILVA, Daniela C. MONTEIRO, Maria F. OLIVEIRA, João G. RESENDE, Mayara L. COELHO, Damião P. DE SOUSA, Ronaldo Z. MENDONÇA, Pedro L. S. PINTO, Rivelilson M. FREITAS, Yvonne P. MASCARENHAS a Josué DE MORAES. Structural parameters, molecular properties, and biological evaluation of some terpenes targeting *Schistosoma mansoni* parasite. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2016, **244**, 129–139. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2015.12.003
- [32] Aucubin | ≥99%(HPLC) | Selleck | Immunology & Inflammation related chemical. *selleckchem.com* [online]. [vid. 2021-06-29]. Dostupné z: <https://www.selleckchem.com/products/aucubin.html>
- [33] ZHANG, Lin, Yu-Liang MA, Yang LIU a Yuan-Gang ZU. Development and validation of high liquid performance chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of geniposidic acid and aucubin in rat plasma for pharmacokinetic study after oral administration of Du-zhong tea extract. *Journal of Chromatography B*. 2014, **963**, 62–69.
- [34] HU, Fangdi, Jing AN, Wen LI, Zijia ZHANG, Wenxia CHEN, Changhong WANG a Zhengtao WANG. UPLC-MS/MS determination and gender-related pharmacokinetic study of five active ingredients in rat plasma after oral administration of *Eucommia cortex* extract. *Journal of ethnopharmacology*. 2015, **169**, 145–155.
- [35] XUE, Bingyang, Bo MA, Qi ZHANG, Xiaotian LI, Jianwei ZHU, Ming LIU, Xiujuan WU, Chao WANG a Zimei WU. Pharmacokinetics and tissue distribution of Aucubin,

- Ajugol and Catalpol in rats using a validated simultaneous LC–ESI-MS/MS assay. *Journal of Chromatography B*. 2015, **1002**, 245–253.
- [36] HUANG, Yu-Xing, Liu ER-WEI, Wang LEI, Huo YAN, Wang QIANG, Olajide OLALEYE, Wang TAO a Gao XIU-MEI. LC/MS/MS determination and pharmacokinetic studies of six compounds in rat plasma following oral administration of the single and combined extracts of *Eucommia ulmoides* and *Dipsacus asperoides*. *Chinese journal of natural medicines*. 2014, **12**(6), 469–476.
- [37] POYER, W. A. a J. P. STANLEY. A suggested mechanism for the production of malondialdehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J. Org. Chem.* 1975, **40**, 3615–3117.
- [38] FARMER, Edward E. a Celine DAVOINE. Reactive electrophile species. *Current opinion in plant biology*. 2007, **10**(4), 380–386.
- [39] YANG, Yang, Bing YIN, Le LV, Ziyang WANG, Jiao HE, Ziyang CHEN, Xin WEN, Yongmin ZHANG, Wenji SUN a Yang LI. Gastroprotective effect of aucubin against ethanol-induced gastric mucosal injury in mice. *Life sciences*. 2017, **189**, 44–51.
- [40] HO, Jin Nyoung, Yoo Hyun LEE, Jong Seok PARK, Woo Jin JUN, Hye Kyung KIM, Bum Shik HONG, Dong Hoon SHIN a Hong Yon CHO. Protective effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005, **28**(7), 1244–1248.
- [41] JEONG, Hyun-Ja, Hyun-Na KOO, Ho-Jeong NA, Mi-Sun KIM, Seung-Heon HONG, Jung-Woo EOM, Kyung-Suk KIM, Tae-Yong SHIN a Hyung-Min KIM. Inhibition of TNF- α and IL-6 production by aucubin through blockade of NF- κ B activation in RBL-2H3 mast cells. *Cytokine*. 2002, **18**(5), 252–259.
- [42] YEN, Gow-Chin a Chiu-Luan HSIEH. Antioxidant activity of extracts from *Du-zhong* (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998, **46**(10), 3952–3957.
- [43] HONG, Nam-Doo, Young-Soo RHO, Jong-Woo KIM, Do-Hee WON, Nam-Jae KIM a Bo-Sun CHO. Studies on the general pharmacological activities of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 1988, **19**(2), 102–110.
- [44] TSAI, Tsung-Hsien, Tzung-Hsun TSAI, Wen-Huey WU, Jonathon Te-Peng TSENG a Po-Jung TSAI. In vitro antimicrobial and anti-inflammatory effects of herbs against *Propionibacterium acnes*. *Food Chemistry*. 2010, **119**(3), 964–968.
- [45] PARK, Sun Ae, Myung-Sook CHOI, Un Ju JUNG, Myung-Joo KIM, Dong Ju KIM, Hae-Mo PARK, Yong Bok PARK a Mi-Kyung LEE. *Eucommia ulmoides* Oliver leaf extract increases endogenous antioxidant activity in type 2 diabetic mice. *Journal of Medicinal Food*. 2006, **9**(4), 474–479.
- [46] HOSOO, Shingo, Masahiro KOYAMA, Mai KATO, Tetsuya HIRATA, Yasuyo YAMAGUCHI, Hiroo YAMASAKI, Atsunori WADA, Keiji WADA, Sansei NISHIBE a Kozo NAKAMURA. The restorative effects of *Eucommia ulmoides* Oliver

- leaf extract on vascular function in spontaneously hypertensive rats. *Molecules*. 2015, **20**(12), 21971–21981.
- [47] CHANG, I.-M., H. S. YUN, Y. S. KIM, MS a J. W. AHN. Aucubin: potential antidote for alpha-amanitin poisoning. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 1984, **22**(1), 77–85.
- [48] CHANG, Ii-Moo a Yoshio YAMAURA. Aucubin: A new antidote for poisonous Amanita mushrooms. *Phytotherapy Research*. 1993, **7**(1), 53–56.
- [49] CHANG, I. M., J. C. RYU, Y. C. PARK, H. S. YUN a Kyu Hwan YANG. Protective activities of aucubin against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Drug and chemical toxicology*. 1983, **6**(5), 443–453.
- [50] XUE, HongYu, LiJi JIN, Lei JIN, Peng ZHANG, DanQing LI, YanQiu XIA, YaNan LU a YongPing XU. Neuroprotection of aucubin in primary diabetic encephalopathy. *Science in China Series C: Life Sciences*. 2008, **51**(6), 495–502.
- [51] XUE, Hong-Yu, Lei JIN, Li-Ji JIN, Xiao-Yu LI, Peng ZHANG, Yong-Sheng MA, Ya-Nan LU, Yan-Qiu XIA a Yong-Ping XU. Aucubin prevents loss of hippocampal neurons and regulates antioxidative activity in diabetic encephalopathy rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2009, **23**(7), 980–986.
- [52] STRÁNSKÝ, Pavel. Přírodní látky v léčbě osteoartrózy. 2006.
- [53] WANG, Sheng-nan, Guo-ping XIE, Cheng-he QIN, Yi-rong CHEN, Kai-rui ZHANG, Xue LI, Qian WU, Wei-qiang DONG, Jun YANG a Bin YU. Aucubin prevents interleukin-1 beta induced inflammation and cartilage matrix degradation via inhibition of NF- κ B signaling pathway in rat articular chondrocytes. *International immunopharmacology*. 2015, **24**(2), 408–415.
- [54] LI, Yutong, Wenji HU, Guanghong HAN, Wenqian LU, Dongxu JIA, Min HU a Di WANG. Involvement of bone morphogenetic protein-related pathways in the effect of aucubin on the promotion of osteoblast differentiation in MG63 cells. *Chemico-biological interactions*. 2018, **283**, 51–58.
- [55] LI, Yutong, Yongfeng ZHANG, Xinrui ZHANG, Wenqian LU, Xin LIU, Min HU a Di WANG. Aucubin exerts anti-osteoporotic effects by promoting osteoblast differentiation. *Aging (Albany NY)*. 2020, **12**(3), 2226.
- [56] JANKOVIĆ, Teodora, Nebojša MENKOVIĆ, Gordana ZDUNIĆ, Ivana BEARA, Kristina BALOG, Katarina ŠAVIKIN a Neda MIMICA-DUKIĆ. Quantitative determination of aucubin in seven plantago species using hplc, hptlc, and lc-esi-ms methods. *Analytical letters*. 2010, **43**(16), 2487–2495.
- [57] RYMKIEWICZ, Apoloniusz. BADANIA NAD GATUNKAMI Z RODZAJU PLANTAGO L. Z WUZGLEDNINIEM KARPOLOGII I CHEMOTAKSONOMII. 1979.

- [58] LONG, C., C. MOULIS, E. STANISLAS a I. FOURASTE. L'aucuboside et le catalpol dans les feuilles de *Plantago lanceolata* L., *Plantago major* L. et *Plantago media* L. *Journal de pharmacie de Belgique*. 1995, **50**(6), 484–488.
- [59] OSINSKA, Ewa, Wiesława ROSŁON, Anna GESZPRYCH, Aneta MORAWSKA a Lukasz GONTAR. EFFECT OF PLANT DENSITY ON GROWTH, DEVELOPMENT AND QUALITY OF RIBWORT PLANTAIN (*PLANTAGO LANCEOLATA* L.). *Journal of International Scientific Publications: Agriculture & Food*. 2014, **2**, 267–277.
- [60] TAMURA, Yoshifumi a Sansei NISHIBE. Changes in the concentrations of bioactive compounds in plantain leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, **50**(9), 2514–2518.
- [61] WANG, Yanjie, Dengqun LIAO, Minjian QIN a Xian'en LI. Simultaneous determination of catalpol, aucubin, and geniposidic acid in different developmental stages of *Rehmannia glutinosa* leaves by high performance liquid chromatography. *Journal of analytical methods in chemistry*. 2016, **2016**.
- [62] SUOMI, Johanna, Heli SIRÉN, Kari HARTONEN a Marja-Liisa RIEKKOLA. Extraction of iridoid glycosides and their determination by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2000, **868**(1), 73–83.
- [63] JANUROVÁ, Catherine. Analytické hodnocení účinných látek kapalinovou chromatografií [online]. 2008 [vid. 2020-11-30]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/16187>
- [64] HOLČAPEK, Michal. Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. 1999.
- [65] WU, Hsin-Kai, Wu-Chang CHUANG a Shuenn-Jyi SHEU. Separation of nine iridoids by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. 1998, **803**(1–2), 179–187.
- [66] LI, Yanmei, Takahiro SATO, Koichi METORI, Katsuya KOIKE, Qing-Ming CHE a Shushichi TAKAHASHI. The promoting effects of geniposidic acid and aucubin in *Eucommia ulmoides* Oliver leaves on collagen synthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 1998, **21**(12), 1306–1310.
- [67] DIETZ, Marko, Susanne MACHILL, Herbert C. HOFFMANN a Knut SCHMIDTKE. Inhibitory effects of *Plantago lanceolata* L. on soil N mineralization. *Plant and Soil*. 2013, **368**(1), 445–458.
- [68] BOX, Lisa A., Grant R. EDWARDS a Racheal H. BRYANT. Seasonal and diurnal changes in aucubin, catalpol and acteoside concentration of plantain herbage grown at high and low N fertiliser inputs. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 2019, **62**(3), 343–353.
- [69] XU, Ji-Kun, Ming-Fei LI a Run-Cang SUN. Identifying the impact of ultrasound-assisted extraction on polysaccharides and natural antioxidants from *Eucommia ulmoides* Oliver. *Process Biochemistry*. 2015, **50**(3), 473–481.

- [70] LI, Yanmei, Katsuya KOIKE, Qing-ming CHE, Masahiro YAMAGUCHI a Shushichi TAKAHASHI. Changes in Lactate Dehydrogenase and 3-Hydroxyacetyl-CoA Dehydrogenase Activities in Rat Skeletal Muscle by the Administration of *Eucommia ulmoides* OLIVER Leaf with Spontaneous Running-training. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 1999, **22**(9), 941–946.
- [71] GONDA, Sándor, László TÓTH, Gyöngyi GYÉMÁNT, Mihály BRAUN, Tamás EMRI a Gábor VASAS. Effect of high relative humidity on dried *plantago lanceolata* L. leaves during long-term storage: Effects on chemical composition, colour and microbiological quality. *Phytochemical Analysis*. 2012, **23**(1), 88–93.
- [72] GONDA, Sándor, Attila KISS, Tamás EMRI, Gyula BATTA a Gábor VASAS. Filamentous fungi from *Plantago lanceolata* L. leaves: contribution to the pattern and stability of bioactive metabolites. *Phytochemistry*. 2013, **86**, 127–136.
- [73] *Aucubin analytical standard | 479-98-1* [online]. [vid. 2021-06-30]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sial/55561?context=product>
- [74] *6775 FreezerMill | RMI, s.r.o.* [online]. [vid. 2021-06-30]. Dostupné z: <http://www.rmi.cz/6775-freezermill>