

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

ZUZANA BLÁHOVÁ

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Antioxidační vlastnosti houby *Cordyceps sinensis* během procesu simulovaného
trávení

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Zuzana Bláhová**
Osobní číslo: **C19418**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Antioxidační vlastnosti houby *Cordyceps sinensis* během procesu simulovaného trávení**
Téma práce anglicky: **Antioxidant properties of *Cordyceps sinensis* during *in vitro* digestion proces**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. S využitím odborných článků (časopisů a knih) zpracujte přehled o botanickém zařazení hub rodu *Cordyceps*, obsahu významných látek a jejich vlivu na zdraví člověka. Uveďte přehled chemických metod stanovení antioxidačních vlastností potravinářských vzorků.
2. Experimentálně stanovte vliv *in vitro* trávicího procesu na antioxidační vlastnosti vzorku houby.
3. Výsledky přehledně zpracujte a diskutujte s dostupnou literaturou. Uveďte, zda přítomnost trávicích enzymů má vliv na antioxidační vlastnosti.

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

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Karel Ventura, CSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 21. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Antioxidační aktivita houby *Cordyceps sinensis*. během procesu simulovaného trávení 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:

.....

Zuzana Bláhová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala panu doc. Ing. Liboru Červenkoví, Ph.D., vedoucímu bakalářské práce, za jeho velmi cenné rady, věcné připomínky, vstřícnost při konzultacích a vypracování. Děkuji také paní Ing. Michaele Frühbauerové za odborný dohled a konzultaci při zpracování experimentální části mé práce. Na závěr bych také chtěla poděkovat mé rodině za velkou podporu a trpělivost po celou dobu studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se věnuje charakteristice houby *Cordyceps sinensis*, antioxidační aktivitě a metodám, kterými ji lze stanovit, v neposlední řadě také všeobecnému popisu gastrointestinálního traktu a modelům trávení *in vitro*. V praxi byl proveden simulovaný proces trávení *in vitro* se vzorkem obsahující *Cordyceps sinensis*. Následně byla pomocí třech spektrálních metod stanovena antioxidační aktivita vzorku. Dané výsledky byly statisticky porovnány.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cordyceps sinensis, antioxidační aktivita, spektrální metody, gastrointestinální trakt, modely trávení *in vitro*.

TITLE

Antioxidant properties of *Cordyceps sinensis* during the simulated digestion process.

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the characteristics of the fungus *Cordyceps sinensis*, antioxidant activity and methods by which it can be determined and, last but not least, the general description of the gastrointestinal tract and *in vitro* digestion models. In practice, a simulated process of digestion *in vitro* was performed with a sample containing *Cordyceps sinensis*. Subsequently, the antioxidant activity of the sample was determined using three spectral methods. The results were statistically compared.

KEYWORDS

Cordyceps sinensis, antioxidant activity, spectral methods, gastrointestinal tract, *in vitro* digestion models.

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	10
SEZNAM TABULEK	10
SEZNAM ROVNIC.....	11
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	11
ÚVOD.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA CORDYCEPS SINENSIS	14
1.1.1 Taxonomie a životní cyklus.....	14
1.1.2 Výskyt.....	16
1.1.3 Sklizeň a distribuce	17
1.1.4 Farmaceutické využití.....	18
1.1.5 Extrakce účinných látek z houby <i>Cordyceps sinensis</i>	19
1.2 OBSAH VÝZNAMNÝCH BIOCHEMICKÝCH LÁTEK	20
1.2.1 Nukleosidy	20
1.2.2 Cordycepin.....	21
1.2.3 Nukleotidy	22
1.2.4 Kyselina cordycepsová	22
1.2.5 Sacharidy	23
1.2.6 Steroly.....	25
1.2.7 Ostatní chemické složky	26
1.3 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA	28
1.3.1 Oxidační stres	28
1.3.2 Produkce volných radikálů a oxidantů.....	28
1.3.3 Antioxidanty	29
1.3.4 Rozdělení antioxidantů	30
1.3.5 Hlavní metody stanovení antioxidační aktivity	31
1.3.6 Další metody stanovení antioxidační aktivity.....	32
1.4 SPEKTRÁLNÍ METODY	33
1.4.1 Elektromagnetické záření	33
1.4.2 UV/Vis Spektrofotometrie.....	34
1.4.3 Spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity	37
1.4.4 Fluorimetrické stanovení antioxidační aktivity	39

1.5	GASTROINTESTINÁLNÍ TRAKT (GIT).....	41
1.5.1	Vymezení gastrointestinálního traktu	41
1.5.2	Biochemický obsah trávicích šťáv v gastrointestinálním traktu.....	43
1.5.3	Statické a dynamické modely trávení <i>in vitro</i>	44
2	CÍL PRÁCE	45
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
3.1	POUŽITÁ ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY	45
3.2	NAVÁŽKY VZORKU	46
3.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	46
3.3.1	Příprava roztoků slin.....	46
3.3.2	Příprava roztoků žaludečních šťáv.....	46
3.3.3	Příprava roztoku střevních šťáv	46
3.4	ÚPRAVA VZORKU	46
3.4.1	Extrakce vzorku methanolem	46
3.4.2	Úprava vzorků pomocí trávicích šťáv – proces <i>in vitro</i>	46
3.4.3	Úprava vzorku pomocí minerálních roztoků	47
3.4.4	Extrakce pevného podílu po předchozí extrakci.....	47
3.5	POSTUPY MĚŘENÍ PRO JEDNOTLIVÉ METODY	48
3.5.1	Metoda FRAP	48
3.5.2	Metoda ABTS	48
3.5.3	Metoda Folin-Ciocalteu	48
4	VYHODNOCENÍ.....	49
4.1	STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY	49
4.1.1	Metoda FRAP	49
4.1.2	Metoda ABTS	51
4.1.3	Metoda Folin-Ciocalteu	52
5	VÝSLEDKY A DISKUSE:	54
6	ZÁVĚR.....	55
	POUŽITÁ LITERATURA	56

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Cordyceps sinensis	14
Obrázek 2: Životní cyklus Cordyceps sinensis	16
Obrázek 3: Oblasti výskytu houby Cordyceps sinensis	17
Obrázek 4: Struktura adenosin	21
Obrázek 5: Struktura cordycepinu	21
Obrázek 6: Necyklická struktura D-mannitolu	22
Obrázek 7: Struktura sloučeniny H1-A	25
Obrázek 8: Struktury Cordyceamidu A a B	27
Obrázek 9: Rozmezí oblastí elektromagnetického záření	34
Obrázek 10: Schéma spektrofotometru	36
Obrázek 11: Reakce radikálu DPPH s donorem vodíku	37
Obrázek 12: Vznik radikálu ABTS•+ a následná reakce s antioxidantem	38
Obrázek 13: Redukce železitého komplexu	39
Obrázek 14: Reakce fenolických sloučenin s kyselinami v alkalickém prostředí	39
Obrázek 15: Schéma lidské trávicí soustavy	41
Obrázek 16: Použitý vzorek houby Cordyceps sinensis	45
Obrázek 17: Přehled úprav a názvů vzorků	47
Obrázek 18: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci Troloxu	50
Obrázek 19: Antioxidační aktivita jednotlivých vzorků pro metodu FRAP	50
Obrázek 20: Kalibrační závislost úbytku absorbance (%) na koncentraci Troloxu	51
Obrázek 21: Antioxidační aktivita jednotlivých vzorků pro metodu ABTS	52
Obrázek 22: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové	53
Obrázek 23: Antioxidační aktivita jednotlivých vzorků pro metodu Folin-Cicolteu	53

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Taxonomie houby Cordyceps sinensis	14
---	----

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1: Výpočet energie.....	33
Rovnice 2: Výpočet frekvence.....	33
Rovnice 3: Výpočet absorbance dle L-B zákona.....	34
Rovnice 4: Výpočet absorbance	34
Rovnice 5: Výpočet transmitance	35
Rovnice 6: Přepočtení transmitance na %	35
Rovnice 7: Přepočtení absorbance a transmitance	35
Rovnice 8: Výpočet úbytku absorbance v %	51

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

TČM	tradiční čínská medicína
USD	americký dolar
UPLC	ultravýkonná kapalinová chromatografie (Ultra Performance Liquid Chromatography)
AMP	adenosin-5'-monofosfát
UMP	uridin-5'-monofosfát
GMP	guanosin-5'-monofosfát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfát – polyakrylamidová gelová elektroforéza
ROS	reaktivní formy kyslíku
RNS	reaktivní formy dusíku
NADPH	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát
UV	ultrafialové záření
Vis	viditelné záření
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

TEAC	celková antioxidační kapacita vztažená ke standardu Troloxu (Trolox Equivalent Antioxidant Kapacity)
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
TPC	celkový obsah fenolických sloučenin (Total Phenolic Content)
FRAP	metoda stanovení antioxidační aktivity založená na redukci železitých komplexů (Feric Reducing Antioxidant Power)
ORAC	metoda stanovení antioxidační aktivity založená na shášení fluorescence (Oxygen Radical Absorbance Kapacity)
HORAC	metoda stanovení antioxidační aktivity založena na mechanismu eliminace kyslíkových radikálu (Hydroxyl Radical Averting Capacity)
TRAP	luminometrická metoda používána k stanovení antioxidační aktivity (Total Radical – trapping Antioxidant Parameter)
GIT	gastrointestinální trakt
GAE	ekvivalent kyseliny gallové (Gallic acid equivalent)

ÚVOD

Cordyceps sinensis (housesnice čínská) je druh endemické, entomopatogenní houby, jejíž výskyt se vymezuje na oblast Himálají. Spadá do rodu *Cordyceps* (novodobě *Ophiocordyceps*), taktéž jako další významný zástupce tohoto rodu parazitická houba *Cordyceps militaris* (housesnice červená). *Cordyceps sinensis* vytváří komplex skládající se z plodnice houby a larvy hostitele. Houba ukládá do hostitele své spory, které později prorůstají tělem larvy, až dojde k úplné mumifikaci [1–3].

Druhy hub patřící do rodu *Cordyceps* mají významnou historii z hlediska využití v tradiční čínské medicíně. První zmínky o použití těchto hub při léčbě infekčních onemocnění pocházejí z Číny a jsou staré přes 2000 let. Konkrétní zmínka o *Cordyceps sinensis* pochází z čínské dynastie Tang (rok 620). V Číně byl *Cordyceps sinensis* oficiálně schválen jako lék od roku 1964. Do Evropy se první informace o této houbě dostaly v období 18. století. Kdy byly její léčebné účinky probírány na vědeckém setkání v Paříži v roce 1726. Ovšem celosvětovou pozornost si *Cordyceps sinensis* získal až v roce 1993. V tomto roce se konaly Národní atletické hry v Pekingu, při kterých tři čínské běžkyně překonaly pět světových rekordů. Později jejich trenér sdělil, že atletky užívaly extrakt právě z této houby [3–5].

Cordyceps sinensis má bohaté složení bioaktivních látek. V TČM (tradiční čínská medicína) se využívá k léčbě kardiovaskulárních onemocněním, onemocněním ledvin a jater, při léčbě rakoviny a řadu dalších. Napomáhá při léčbě impotence, z tohoto důvodu bývá často označován jako tzv. Himálajská viagra. *Cordyceps sinensis* byl zkoumán ve studii *in vitro*, ale také *in vivo*. Studiem byly prokázány jeho antimikrobiální, protirakovinné, antivirotické, antioxidační účinky a mnoho dalších [2, 3, 6].

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA CORDYCEPS SINENSIS

1.1.1 Taxonomie a životní cyklus

Tabulka 1: Taxonomie houby *Cordyceps sinensis*

Český název:	housesnice čínská (Obr. 1)
Tibetský název:	yarsta gunbu
Nepálský název:	yarshagumba
Čínský název:	dong chong xia cao
Latinský název:	<i>Cordyceps sinensis</i> (novodobě <i>Ophiocordyceps sinensis</i>)
Říše:	houby (Fungi)
Oddělení:	vřeckovýtrusné (Askomycety)
Třída:	Sordariomycetes
Řád:	Hypocreales
Čeleď:	Ophiocordycipitaceae
Rod:	<i>Ophiocordyceps</i>



Obrázek 1: *Cordyceps sinensis* [7]

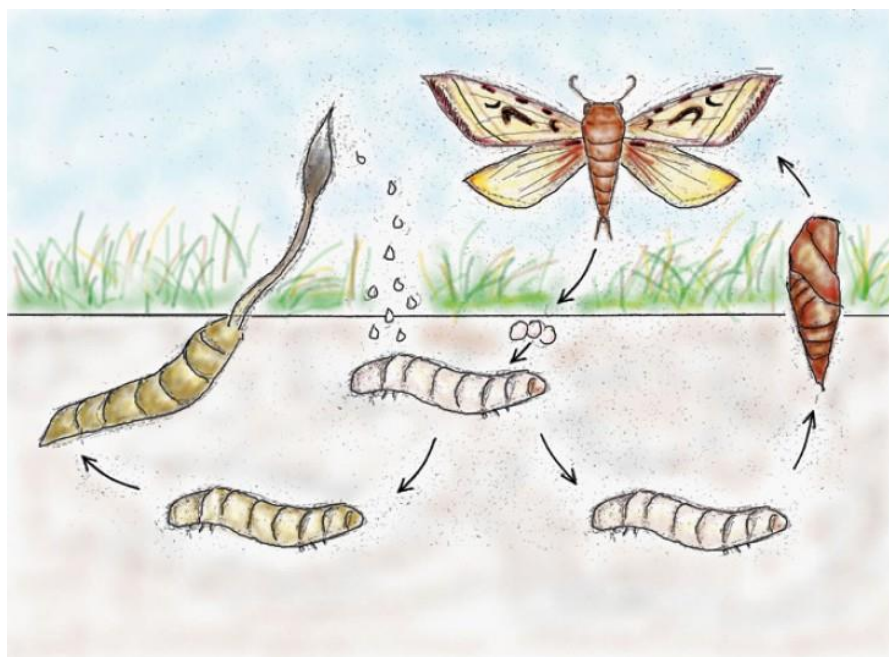
Většina hub pocházející z rodu *Ophiocordyceps* se řadí mezi endoparazity. Nejčastěji se živí hmyzem, členovci a vybrané druhy i ostatními houbami. Tyto organismy si vyvinuly vysoce specifické a složité mechanismy, díky kterým dokážou obejít imunitní systém hostitele, přičemž se vytvářejí speciální metabolity. Dochází k úplné koordinaci životního cyklu parazita s cyklem hostitele tak, aby parazit přežil co nejdéle a došlo k co nejúčinnější reprodukci houby [8].

Životní cyklus houby *Cordyceps sinensis* lze obecně rozdělit do tří fází. Jako první se označuje tzv. fáze primární infekce. Zde dochází k infikaci těla hostitele spory. Spory se do těla hostitele mohou dostat přes ústní dutinu, tělní stěnu nebo přes štěrbinu. Hlavními hostiteli parazita jsou můry *Hepialus armoricanus* z rodu *Thitarodes*. Životní cyklus tohoto hmyzu se skládá ze čtyř stádií – vajíčko, larva, kukla a dospělý jedinec (Obr. 2). Přeměna larvy v dospělce trvá 2 až 4 roky. Nedospělé larvy na se na podzim zahrabávají pod zem do hloubky okolo 15 cm. K infikaci může docházet ještě před samotným zahrabáním larvy do země. Ovšem častěji probíhá infikace housenky ve stádiu, kdy se již nachází pod zemí. Vlivem dešťů totiž dochází k propustnosti spor hlouběji do půdy [1, 4, 9, 10].

V laboratoři bylo zjištěno, že housenka zůstává živá ještě 5 až 12 měsíců po nákaze, ovšem ve volné přírodě to může být i déle. Během tohoto období nastává druhá fáze označovaná jako parazitická. Houba využívá živiny z těla hostitele a spory začínají přerůstat v mycelium (Obr. 2) [1].

Současně na druhou fázi navazuje třetí fáze, a to fáze saprofytická. V tomto stádiu je již housenka po smrti a vyskytuje se v hloubce 2 až 5 cm pod zemí. Je umístěna svisle hlavou nahoru a tím umožňuje stromatům vyrůstat z půdy. Pokud nastanou dostatečně vhodné podmínky, dochází k tvorbě plodnic houby, která ústí z hlavy housenek. Plodnice se barví do hnědé až načervenalé barvy. Naopak již mumifikované tělo housenky mění svou barvu na zelenou až nahnědlou. V momentě, kdy plodnice začne produkovat askospory (pohlavní výtrusy), může parazit napadat další hostitele. U *Cordyceps sinensis* byly zaznamenány oba způsoby rozmnožování. Houba se tedy může rozmnožovat jak pohlavně (telemorfně) tak i nepohlavně (anamorfně) [1, 4].

Díky tomuto celému procesu je houba v Číně známá pod názvem dong chong xia cao, což v překladu znamená „červ v zimě a bylina v létě“ [2].



Obrázek 2: Životní cyklus *Cordyceps sinensis* [11]

1.1.2 Výskyt

Cordyceps sinensis se řadí mezi psychrofilní organismy. Jeho přirozený výskyt se vymezuje na oblast Himálají (Obr. 3), konkrétně pak na Tibetskou náhorní plošinu, Čínu, Indii, Bhútán a Nepál. Vegetaci v těchto oblastech vytváří alpské louky, subalpské louky a keřovité louky. Velmi často se parazitický komplex vyskytuje v blízkosti kořenů rostlin křídlatky a ostřice. Pro larvální stádium hostitele jsou výhonky těchto rostlin hlavní obživou [1, 2, 12, 13].

Vhodnými podmínkami pro jeho růst jsou vyšší nadmořské výšky a vlhká prostředí, kdy průměrný roční úhrn srážek činí minimálně 350 mm. Jelikož se jedná o parazitický druh organismu, je jeho výskyt úzce spjat s výskytem jeho hostitele. Dříve se rozmezí přirozeného výskytu housenek z rodu *Thitarodes* pohybovalo okolo 3900 až 4400 m.n.m. V období dvou desetiletí došlo, z důvodu klimatických změn, k vertikálnímu posunu horní hranice výskytu těchto housenek o 200 až 500 metrů výše. Tím se tedy změnilo i působiště parazita. V současnosti se tyto organismy vyskytují v nadmořských výškách v rozsahu 4400 až 4600 m.n.m [1, 14, 15].



Obrázek 3: Oblasti výskytu houby *Cordyceps sinensis* [16]

1.1.3 Sklizeň a distribuce

Významnými oblastmi pro sklizeň *Cordyceps sinensis* jsou provincie Qinghai (Tibet), Sichuan a Yunnan (Čína). Ke sklizni dochází i na jiných místech Himálajského pohoří. Sběr obvykle začíná na přelomu května a června. Celková doba sklizně trvá přibližně šest týdnů. Lidé se ze vzdálených míst sjíždějí na sběrná místa. Obyvatelé vysokohorských oblastí se většinu roku živí chovem dobytka a pěstováním bylin. Obecně je ale v těchto oblastech nízká zemědělská produktivita, z toho důvodu jsou lidé nuceni vyhledávat jiný zdroj obživy. Valná většina z nich se zapojuje do krátkodobých sezónních sklizní, jako je právě sklizeň houby *Cordyceps sinensis*. Například v Dolpě (oblast v Nepálu) tvoří výnosy ze sběru této houby až 53,3 % celkového rodinného příjmu [14, 17–19].

Jeden kus houby *Cordyceps sinensis*, který je dlouhý přibližně 5 cm, se na čínském trhu prodává za více než 50 USD (1120 Kč). Tato hodnota překonala mezinárodní cenu zlata. Důležitým ukazatelem kvality je poměr velikosti stromatu houby k velikosti těla mumifikované housenky. Ideální velikost je, když délka stromatu nepřesahuje délku těla housenky nebo když je o něco kratší. Tento správný poměr značí vhodné načasování sklizně. Odhadnou skutečnou cenu je obtížné, protože většina obchodů probíhá nelegálně. Vysoká tržní cena zapříčiňuje nadměrnou sklizeň, což vede ke každoročnímu snížení intenzity výskytu této houby. Na trhu dochází k velkému nepoměru mezi poptávkou a nabídkou, to má za následek neustále zvyšující se kupní

ceny. Ovšem komplex houba-housenka jako takový, se konzumuje převážně v Číně, Japonsku a obecně ve východní Asii. V Evropě je *Cordyceps sinensis* znám především jako extrakt v podobě prášku, který se konzumuje v kapslích. Tento práškový extrakt se vyrábí rozemletím uměle vypěstovaného mycelia pomocí fermentace. V současnosti se pro kultivaci používají odvozené kultury označované jako *Paecilomyces hepiali* (kmen CS-4) a *Cephalosporium sinensis* [14, 16, 17].

1.1.4 Farmaceutické využití

Cordyceps sinensis se mezinárodně využívá jako doplněk stravy při léčbě širokého spektra onemocnění. Nejčastěji bývá užíván ve formě kapslí obsahující práškový extrakt. Pozitivní účinky byly zaznamenány u léčby astmatu, alergické rýmy, špatné funkce ledvin a plic, při onemocnění dýchacích cest, regulaci krevního tlaku. Pomáhá při posílení celkové imunity organismu a konkrétně pak u žen bývá indikován jako regulátor nepravidelné menstruace. Jelikož má *Cordyceps sinensis* antivirové účinky a zajišťuje ochrannou funkci plic, bylo ve studii zjištěno, že napomáhá také při léčbě novodobého respiračního onemocnění COVID-19 [14, 20, 21].

OBECNÉ FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI CORDYCEPS SINENSIS:

- **Protirakovinná aktivita**

Většina bioaktivních složek, které se v *Cordyceps sinensis* nacházejí, vykazují protirakovinnou aktivitu. Významnou složkou je cordycepin. Ve studii bylo prokázáno, že vykazuje protinádorovou aktivitu vůči melanomovým buňkám typu B16 u myši. Dále také napomáhá ke ztrátě životaschopnosti rakovinných buněk žlučníku a indukuje apoptózu u Leydigova myšního tumoru. Dokáže regulovat buněčný cyklus, což vede ke snížení růstu testikulárních nádorů, buněk rakoviny žaludku a děložního čípku. V neposlední řadě dovede cordycepin aktivovat kaspázové kaskády, což má za následek odstranění nádorových buněk z jazyka a ostatních orálních orgánů. Obecně pak houby z rodu *Cordyceps* mají anti leukemické účinky a využívají se jako model k léčbě toho typu rakoviny [3, 22, 23].

- **Antioxidační aktivita**

Antioxidační aktivita patří mezi nejvýznamnější biologické aktivity, které poskytuje výtažek z *Cordyceps sinensis*. U této houby jsou to především polysacharidy, které zajišťují ochranu buňky před poškozením volnými radikály. Silné antioxidační účinky poskytují vodné a ethanolové extrakty. Studií bylo zjištěno, že k největšímu pohlčení volných kyslíkových

radikálů došlo u extraktu přírodního mycelia v horké vodě (70 °C po dobu 5 minut). Vodný extrakt vykazoval inhibiční účinek proti peroxidaci lipidů v médiu [3, 24].

- **Imunomodulační aktivita**

Imunitní reakce představuje pro organismus důležitou obranyschopnost proti napadení patogeny. Studií *in vitro* bylo prokázáno, že polysacharidy *Cordyceps sinensis* mohou regulovat imunitní aktivitu makrofágů, dendritických buněk a T-lymfocytů [25].

- **Ostatní významné vlastnosti**

Kromě výše zmiňovaných aktivit vykazují látky obsažené v *Cordyceps sinensis* i řadu dalších vlastností, které mají pozitivní vliv na lidský organismus. Působí protizánětlivě, antivirově, antibakteriálně a dokážou inhibovat proces stárnutí. Dále působí jako probiotikum, převážně polysacharidy se podílí na zlepšení imunoprese střev. Bioaktivní látky podporují metabolismus glukózy a uvolňování inzulínu. V neposlední řadě vytváří ochranu pro orgány jako jsou např. ledviny a játra [3, 22, 23].

1.1.5 Extrakce účinných látek z houby *Cordyceps sinensis*

Účinné složky se z houby *Cordyceps sinensis* získávají pomocí extrakce. Způsob provedení extrakce se liší podle zvoleného rozpouštědla. Zásadní rozdíl mezi rozpouštědly je jejich polarita. Mezi nejpoužívanější se s narůstající polaritou řadí ethylacetát, ethanol, methanol a voda. Každý extrakt pak vykazuje silné bioaktivní účinky [2, 5].

TYPY EXTRAKCÍ:

- **Extrakce vodou**

Voda představuje vysoce polární rozpouštědlo, díky němuž lze extrahovat polární sloučeniny z *Cordyceps sinensis*, jako jsou např. nukleosidy a polysacharidy. Pro tuto extrakci byly studii zjištěny ideální podmínky, při kterých je voda smíchána s práškovým extraktem v poměru 2,5 : 1, pH se pohybuje v rozmezí 7,5 až 8,0 po dobu 24 hodin. Pro vyšší účinnost se používá extrakce horkou vodou, kdy se teplota vody zvýší přibližně na 70 °C. Voda se často používá v oblasti potravinářské chemie převážně pro svůj netoxický charakter a lehkou dostupnost [2, 5].

Molekulární struktura vody obsahuje dipóly. Dokáže rozpouštět ionty tím, že se orientuje podle elektrostatické přitažlivosti mezi iontem a molekulou vody. Vytváří si hydratační obal a tím dochází k dosažení stability [5].

- **Extrakce alkoholem**

U tohoto typu extrakce se jako rozpouštědla nejčastěji používají methanol a ethanol případně jejich vodné roztoky. Alkoholové extrakce se využívají pro získání nukleosidů, polysacharidů a proteinů. Methanolvý extrakt, který lze získat z kultivační tekutiny *Cordyceps sinensis* vykazuje cytotoxický účinek proti rakovinným buňkám. Ethanolvý extrakt pak vykazuje silnou antioxidační aktivitu a zachovává funkci β -buněk [2].

- **Extrakce ethylacetátem**

Extrakce ethylacetátem se provádí i u jiných biochemicky významných skupin než u výše zmiňovaných extrakcí. Využívá se např. u extrakce sacharidů, adenosinu, ergosterolu a cordycepinu. Výtěžek těchto extrakcí nebývá vysoký. Vzniklý extrakt indukuje apoptózu v buňkách HL60 lidské premyelocytární leukémie [2].

1.2 OBSAH VÝZNAMNÝCH BIOCHEMICKÝCH LÁTEK

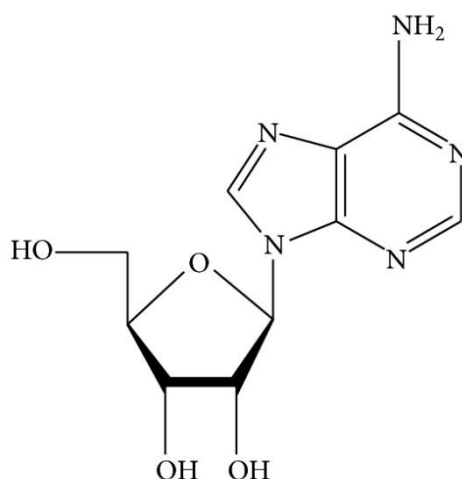
Nukleosidy společně s cordycepinem vytváří hlavní složku chemického obsahu *Cordyceps sinensis*. Jsou to jádrové markery, které představují hlavní ukazatele kvality. Mezi dominantní složky se dále řadí kyselina cordycepsová (D-mannitol) a polysacharidy. *Cordyceps sinensis* obsahuje řadu dalších biochemicky významných látek jako jsou aminokyseliny, polyaminy, nukleové báze, organické kyseliny, steroly, proteiny, v tučích rozpustné vitamíny E a K, ve vodě rozpustné vitamíny B1, B2, B12 a řadu stopových prvků jako např. K, Na, Ca, Mg, Cu, Fe [2, 26, 27].

1.2.1 Nukleosidy

Představují hlavní bioaktivní složku obsahu houby. Jejich deriváty vykazují silné protirakovinné a antivirové účinky, proto bývají často použity při vývoji léků proti rakovině a infekčním chorobám. Doposud bylo z houby izolováno 6 nukleobází včetně cytosinu, adeninu, uracilu, thyminu, hypoxanthinu, guaninu a z nich odvozených 6 nukleosidů včetně adenosinu, inosinu, cytidinu, uridinu, thymidinu, a guanosinu. Nukleosidy a nukleotidy obsažené v houbě lze recipročně převádět. Pro jejich snadné stanovení se často využívá separační metoda UPLC (ultravýkonná kapalinová chromatografie) [5, 26, 28].

Mezi nejvýznamnějšího zástupce nukleosidů v *Cordyceps sinensis* se řadí **adenosin** (Obr. 4). Hraje důležitou roli při biochemických procesech v organismu. Jeho koncentrace je mnohem vyšší u kultivovaného typu houby než u přírodního. U nukleotidu AMP (adenosinmonofosfát) může docházet k degradaci na samotný adenosin. Naopak při oxidativní deaminaci adenosinu

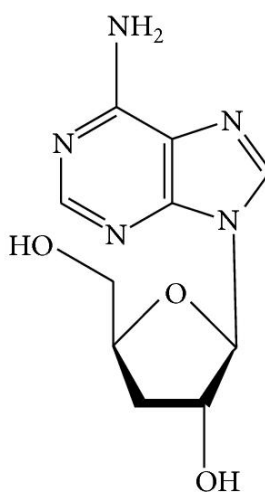
lze získat inosin. Vyskytují se zde i jiné analogy adenosinu jako je např. 2'-deoxyadenosin, 2',3'-dideoxyadenosin, 3'-amino-3'-deoxyadenosin [26].



Obrázek 4: Struktura adenosin [28]

1.2.2 Cordycepin

Byl poprvé izolován z houby *Cordyceps militaris* v roce 1950. Jeho strukturní vzorec byl pojmenován jako 3'-deoxyadenosin. Funkčně se jedná o derivát adenosinu, který se skládá z purinové molekuly spojené s ribózovým cukrem (obr. 5). Vyskytuje se pouze v přírodním typu *Cordyceps sinensis*, a to ve velmi nízkých koncentracích, které se pohybují v rozmezí 0,0076 % až 0,029 %. Cordycepin se účastní transkripce a aktivace polymeráz. Díky své podobnosti s adenosinem se také účastní v dalších mnoha molekulárních procesech v buňce. Byly u něj popsány četné farmakologické projevy. Mezi nejvýznamnější patří protinádorová aktivita, neuroprotektivní působení, antioxidační aktivita, protizánětlivá aktivita a biocidní účinky [23, 26, 29].



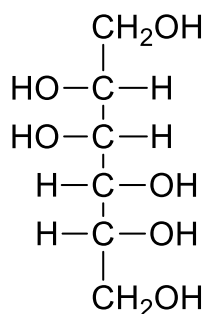
Obrázek 5: Struktura cordycepinu [28]

1.2.3 Nukleotidy

V *Cordyceps sinensis* byly stanoveny 3 nukleotidy uridin-5'-monofosfát (UMP), adenosin- 5'- monofosfát (AMP) a guanosin-5'-monofosfát (GMP). Nukleotidy AMP, GMP a UMP mohou být degradovány na adenosin, guanosin a uridin. Nejvíce obsáhlý je guanosin. Pro analýzu nukleotidů se používá kapalinová chromatografie s reverzní fází a hmotnostní spektrometrie s párováním iontů. Z farmakologického hlediska nukleotidy zesilují imunitní odpověď, napomáhají vstřebávání železa ve střevě, ovlivňují metabolismus mastných kyselin, mohou inhibovat zánět močového ústrojí [26, 28].

1.2.4 Kyselina cordycepsová

Kyselina cordycepsová neboli D-mannitol představuje zástupce alkoholového cukru, který se řadí mezi další významné biochemické složky obsažené v této houbě. Jeho struktura (Obr. 6) byla stanovena jako kyselina 1,3,4,5-tetrahydroxy-cyklohexanová, izomerní s kyselinou chinovou. Od přírodní kyseliny chininové se liší především tím, že je pravotočivá a netvoří lakton. Poprvé byl D-mannitol izolován z houby *Cordyceps sinensis* v roce 1957 a tvoří přibližně 3,4 % jeho suché hmotnosti. Podobně jako u adenosinu je jeho koncentrace vyšší v přírodní odrůdě. Hrál také významnou roli v léčbě jaterní fibrózy jaterních hvězdicových buněk. Byla prokázána jeho antioxidační aktivita a diuretické vlastnosti [2, 28, 30].



Obrázek 6: Necyklická struktura D-mannitolu [30]

1.2.5 Sacharidy

- **Monosacharidy**

Ke stanovení monosacharidů se využívá plynová chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Před samotnou analýzou dochází ještě k předúpravě vzorku, kdy se pomocí hydrolýzy rozruší glykosidické vazby a dochází k rozdělení na jednotlivé monosacharidy. Kvalitativně i kvantitativně bylo v houbě stanoveno přes 10 různých monosacharidů jako např. ribóza, manóza, rhamnóza, xylóza, fruktóza, galaktóza, glukóza, arabinóza, sorbóza a již zmiňovaný mannitol [25, 26].

- **Polysacharidy**

Cordyceps sinensis obsahuje velké množství polysacharidů. Jejich zastoupení se pohybuje v rozmezí 3 až 8 % z celkové hmotnosti houby. Podle umístění v buňkách hub jsou polysacharidy děleny na extracelulární (EPS) a intracelulární (IPS). Intracelulární polysacharidy se získávají extrakcí kultivovaného mycelia, případně z přírodního mycelia. Naopak extracelulární polysacharidy se extrahují z fermentační půdy hub. Nejčastěji se aplikuje extrakce horkou vodou nebo alkalickým činidlem. Pro strukturní analýzu se využívá několik analytických metod. Mezi ty nejpoužívanější patří chromatografie, infračervená spektroskopie, hmotností spektrometrie a nukleární magnetická rezonance. Mezi široce využívaný polysacharid v potravinářství a ve farmacii se řadí β -D-glukan. Významný je pak (1,3)- β -D-glukan, který se využívá pro své imunomodulační a protinádorové aktivity [25, 26, 31, 32].

ROZDĚLENÍ HETEROPOLYSACHARIDŮ:

Heteropolysacharidy v *Cordyceps sinensis* lze rozdělit podle zastoupení monosacharidů na:

1. Skládající se z galaktózy, glukózy a manózy [25].
2. Skládající se z rhamnózy, xylózy, arabinózy, galaktózy a glukózy [25].

ROZDĚLENÍ POLYSACHARIDŮ PODLE TYPU:

1. EPSF

Jedná se o exopolysacharidovou frakci, tedy o heteropolysacharid, který se izoluje z kultivovaného supernatantu. Je složen z následujících monosacharidů: manóza, glukóza, galaktóza v poměru 23 : 1 : 2,6. Nejčastěji se získává ethanolovou extrakcí. EPSF vykazuje silné farmakologické účinky. Mezi ty nejvýznamnější patří protinádorová aktivita společně s imunomodulací, z tohoto důvodu se využívá při studii rakoviny [25, 28].

2. APS

Je to kyselý polysacharid, který se izoluje z kultivovaného mycelia pomocí iontoměničové a velikostní chromatografie. APS se skládá z manózy, glukózy a galaktózy v poměru 3,3 : 2,3 : 1. U toho typu polysacharidu byly zjištěny stimulační účinky vůči makrofágům [28].

3. CPS-1

Je to ve vodě rozpustný polysacharid, který se z mycelia houby izoluje pomocí extrakce horkou vodou, srážením ethanolem a gelovou permeační chromatografií. Funkčně se jedná o glukomannogalaktan, který je složen z glukózy, manózy a galaktózy v poměru 2,8 : 2,9 : 1. Současné studie prokazují, že polysacharid CPS-1 má antioxidační vlastnosti, které se využívají pro snížení hladiny glukózy v krvi a při léčbě onemocnění ledvin [28, 33].

4. CPS-2

Opět se jedná o polysacharid, který se skládá z manózy, glukózy a galaktózy v poměru 4 : 11 : 1. Jeho terapeutická aktivita se využívá proti chronickému selhávání ledvin [28, 34].

5. CS-4

CS-4 se používá jako obecné označení pro úředně schválenou houbu *Paecilomyces hepiali*, která se používá pro komerční fermentaci mycelia *Cordyceps sinensis*. Z tohoto mycelia se následně pomocí extrakce vodou získávají polysacharidy, rovněž označované jako CS-4. Tyto polysacharidy se využívají při léčbě alergické rýmy, astmatu a kardiovaskulárních onemocněních [35, 36].

1.2.6 Steroly

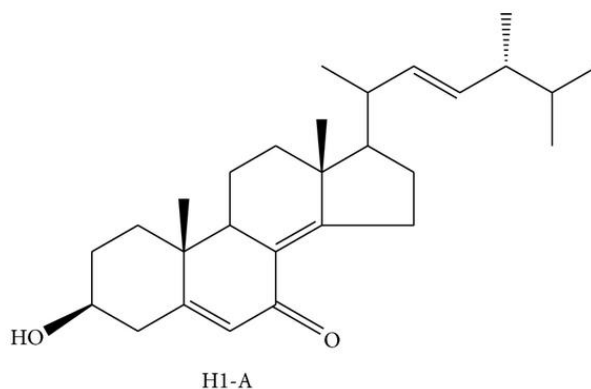
- **Ergosterol**

Patří mezi další významné složky, které se vyskytují v *Cordyceps sinensis*. Obsah ergosterolu vypovídá o stavu mycelia a o biologické funkci houby. Dále je považován za významný chemický aspekt, sloužící k hodnocení celkové kvality houby. Ergosterol se v houbě vyskytuje ve dvou různých formách, jako volný a esterifikovaný. Představuje důležitý zdroj vitamínu D₂. Studií bylo prokázáno několik farmakologických aktivit. Mezi ty nejvýznamnější patří protinádorová aktivita a antibakteriální aktivita, především vůči bakteriím *Enterobacter aerogenes* a *Pseudomonas aeruginosa*. Obecně se ergosterol používá ve farmacii pro výrobu léku na bázi steroidních hormonů. Pro jeho analytické stanovení se využívá metoda HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie), chromatografie anebo hmotnostní spektrometrie [2, 28, 37].

- **Ostatní steroly**

Pomocí tlakové kapalinové extrakce (PLE) a trimethylsilylové derivatizace (TMS) byl v *Cordyceps sinensis* stanoven cholesterol, kampesterol a β -sitosterol. Tyto fytosteroly se využívají při léčbě rakoviny tlustého střeva, prostaty a prsu. Dále byly studií zjištěny další dva steroly izolované z methanolového extraktu a to ergosteryl-3-O-p-D-glukopyranosid a 22,23-dihydroergosteryl-3-O-p-D-glukopyranosid. Jedná se o významné deriváty sterolů, které vykazují protirakovinnou aktivitu [2, 28].

Za atypický příklad sterolu se považuje sloučenina označována jako H1-A, její struktura je popsána jako ergosterol (Obr. 7) připomínající svým uspořádáním testosteron a dehydroepiandrosteron. Tato sloučenina se používá v TČM převážně při léčbě autoimunitních poruch [28].



Obrázek 7: Struktura sloučeniny H1-A [28]

1.2.7 Ostatní chemické složky

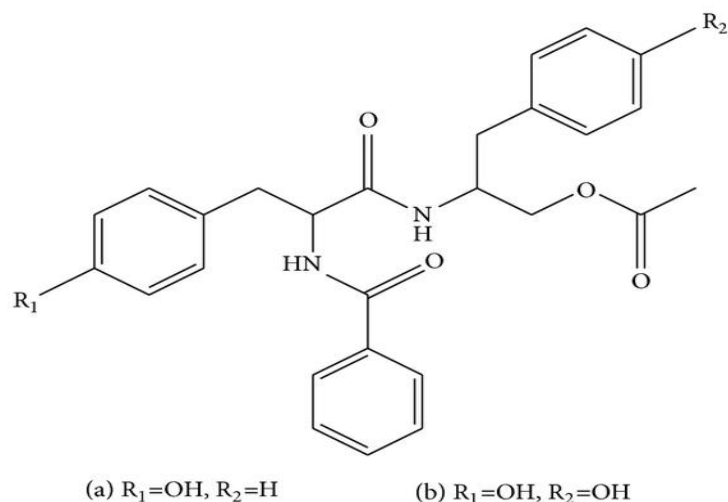
- **Aminokyseliny**

V *Cordyceps sinensis* bylo stanoveno 18 druhů aminokyselin včetně fenylalaninu, leucinu, izoleucinu, tyrosinu, methioninu, valinu, prolinu atd. Většina aminokyselin prokazovala sedativní a hypnotický účinek. Mezi nejúčinnější z těchto složek se řadí tryptofan, který je prekurzorem serotoninového materiálu, který má úzký vztah s nespavostí zvířat. Mezi základní aminokyseliny, které se vyskytují v plodnici a larvě hostitele, patří kyselina glutamová, kyselina asparagová a arginin. U kyseliny glutamové byl prokázán účinek imunitní inhibice [2, 27, 28].

- **Peptidy**

Houba obsahuje neobvyklé cyklické dipeptidy včetně cyklo-[Gly-Pro], cyklo-[Leu-Pro], cyklo-[Val-Pro] cyklo-[Ala-Leu], cyklo-[Ala-Val] a cyklo-[Thr-Leu]. Bylo zjištěno, že cyklické dipeptidy jako cyklo-[Leu-Pro] a cyklo-[Phe-Pro] vykazují antimikrobiální účinky a mají antimutagenní vlastnosti proti růstu enterokoků rezistentních na vankomycin (VRE) a patogenních kvasinek. U zbylých dipeptidů byla prokázána silná protinádorová, antivirová a antibiotická aktivita [2, 27].

Mezi další významné peptidy se řadí **Cordymin**, který lze získat purifikací. Cordymin vykazuje protizánětlivou aktivitu a využívá se při studii diabetické osteopenie. Dále se zde řadí **Cordycedipeptid A**. Funkčně se jedná o cyklodipeptid, který se získává izolací z kultivační tekutiny. Jeho struktura je popsána jako 3-acetamino-6-isobutyl-2,5dioxopiperazin. Jeho farmakologické vlastnosti jsou stále předmětem studií. V neposlední řadě se zde zařazují modifikované dipeptidy pojmenované jako **Cordyceamidy A** (Obr. 8 a.) a **B** (Obr. 8 b.). Tyto dipeptidy byly izolovány z kultivační kapaliny *Cordyceps sinensis*. Jejich struktury byly stanoveny pomocí 1D a 2D nukleární magnetické rezonance jako N-benzoyl-L-tyrosinyl-L-fenylalaninolacetát a N-benzoyl-L-tyrosinyl-Lp-hydroxyfenylalaninolacetát [2, 28, 38, 39].



Obrázek 8: Struktury Cordyceamidu A a B [28]

- **Proteiny**

Valná většina proteinů vyskytující se v houbě jsou enzymy, včetně intracelulárních proteáz a extracelulárních proteáz. Mezi kyselou deoxyribonukleázu, kterou lze získat purifikací z kultivovaného mycelia, se řadí tzv. **CSDnáza**. Purifikace se provádí pomocí $(NH_4)_2SO_4$ precipitace, gelové filtrace, aniontoměničové HPLC a gelové filtrační HPLC. Bylo zjištěno, že se jedná o jednořetězcový protein, jehož molekulová hmotnost činí 34 kDa [28, 40].

Mezi další enzym, získaný purifikací ze supernatantu, patří proteáza **CSP**. U tohoto enzymu byla prokázána fibrinolytická aktivita. Analýza této purifikované proteázy proběhla pomocí metody SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfát – polyakrylamidová gelová elektroforéza), díky ní bylo zjištěno, že se funkčně jedná o polypeptidový řetězec, který má molekulovou hmotnost přibližně 31 kDa a *N*-terminální sekvenování odhalilo, že prvních deset aminokyselinových zbytků enzymu bylo Ala-Leu-Ala-Thr-Gln-His-Gly-Ala-Pro-Trp [41].

1.3 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

Je definována jako schopnost látky inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin. Rozlišují se dva pojmy – antioxidační kapacita a reaktivita. Antioxidační kapacita poskytuje informaci o délce trvání antioxidačního účinku. Reaktivita charakterizuje počáteční dynamiku průběhu antioxidačního procesu při určité koncentraci antioxidantů [42].

1.3.1 Oxidační stres

Oxidační stres je stav, při kterém dochází ke vzniku nerovnováhy mezi antioxidační obranou buňky a oxidanty. Tato nerovnováha vzniká důsledkem působení přebytku oxidantů, jako jsou např. reaktivní formy kyslíku (ROS), dusíku (RNS) a síry (RSS). Ionty přechodných kovů, ve svých nižších oxidačních stavech, nejsou samy o sobě oxidačními látkami, ale mohou vyvolat tvorbu ROS nebo RNS reakcí s peroxidem vodíku nebo molekulárním kyslíkem, čímž slouží jako prooxidanty [43].

Působením nejčastěji ROS a RNS dochází k oxidaci dvojně vazby polynenasycených mastných kyselin v lipidech a tvorbě aldehydů nebo peroxidů. Výsledkem těchto procesů je změna permeability membrány, změna transportu iontů, inaktivace proteinů a modifikace enzymatické aktivity. Oxidační stres bývá vyvolán několika faktory, včetně fyzikálních, chemických a biologickým. Předěšlé studie prokazují, že oxidační stres úzce souvisí se vznikem široké škály onemocnění, jako např. se vznikem rakoviny, schizofrenie, Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, diabetes, zvýšení krevního tlaku a mnoha dalších [43–45].

1.3.2 Produkce volných radikálů a oxidantů

Volné radikály jsou atomy, molekuly nebo ionty s nepárovými elektrony, které jsou vysoce aktivní vůči chemickým reakcím s jinými molekulami. V biologickém systému jsou volné radikály odvozeny z molekul kyslíku, dusíku a síry [46].

Reaktivní formy kyslíku představují nejvýznamnější skupinu oxidantů obsahujících radikály (hydroxylový radikál $\bullet\text{OH}$, perhydroxylový radikál $\text{HO}_2\bullet$, superoxidový anion-radikál $\bullet\text{O}_2^-$, peroxid vodíku H_2O_2). Superoxidový anion-radikál vzniká jako vedlejší produkt v mitochondriálním dýchacím řetězci a je generován NADPH oxidázou, xantinoxidázou a peroxidázami. Hydroxylový radikál, nejreaktivnější ze všech druhů volných radikálů in vivo, vzniká reakcí superoxidového anion-radikálu s peroxidem vodíku, přičemž Fe^{2+} nebo Cu^+ slouží jako reakční katalyzátory (Fentonova reakce). Obecně je známo, že lidský organismus vyprodukuje přibližně 5 g ROS denně. Zvýšená koncentrace ROS v organismu vede k rozkladu buněk a tkání, poruše metabolických funkcí a vzniku onemocnění [43, 44, 46, 47].

Reaktivní formy síry se snadno tvoří z thiolů reakcí s ROS za vzniku alkylsulfanylových radikálů (RS•). Mezi nejběžnějšího zástupce reaktivních forem dusíku (RNS) patří nitroxid (•NO) produkovaný oxidací dusíku katalyzovanou NO-syntázou. Nitroxid je schopen rychle reagovat s ROS (hlavně se superoxidovým aniontovým radikálem) a produkovat další reaktivní sloučeniny dusíku, například peroxydusitan nebo kyselinu peroxydusitou, které lze dále přeměnit na •NO₂ nebo •OH. Tyto produkty mohou iniciovat nové radikálové reakce vedoucí k poškození biomolekul. [43,46].

1.3.3 Antioxidanty

Jedná se o přírodní a syntetické látky, které zabraňují a oddalují poškození buňky, které vzniká působením oxidantů. Antioxidanty inhibují řetězovou reakci oxidace, neutralizují volné radikály tím, že působí jako donory nebo akceptory vodíku, přičemž dochází k odstranění nepárového stavu radikálu. Tímto mechanismem dochází k tvorbě stabilnějších radikálů. Účinnost antioxidantů závisí na několika faktorech [43, 44, 46]:

- Aby byla látka považována za antioxidant, musí být aktivní při nízké koncentraci [43].
- Antioxidant musí být přítomen v dostatečně vysokém množství, aby mohlo dojít k deaktivaci cílové skupiny [43].
- Při reakci s volnými radikály musí být výsledný produkt méně toxický, než byl původní radikál [43].
- Dalším faktorem, který hraje důležitou roli je kinetika reakce. Ta zahrnuje rychlost reakce mezi antioxidantem a odlišným oxidantem, termodynamiku reakce a schopnost antioxidantu reagovat [44].
- Významnou roli hraje také chemická struktura antioxidantu, která určuje jeho vnitřní reaktivitu vůči volným radikálům [44].

1.3.4 Rozdělení antioxidantů

Obecně lze rozdělit antioxidanty do několika skupin. Z hlediska původu jsou rozděleny do dvou základních skupin – na přírodní a syntetické. Většina přírodních antioxidantů pochází z ovoce, zeleniny, koření, obilí a bylin (např. z kurkumy, rozmarýnu, zeleného čaje, hroznového vína, zázvoru a česneku). Obsahují širokou škálu antioxidačních sloučenin, jako jsou fenoly, flavonoidy, karotenoidy, steroidy a thiolové sloučeniny. Syntetické antioxidanty jsou široce používány v potravinářském průmyslu ke zpomalení oxidace lipidů. Tyto syntetické antioxidanty však nejsou výhodné pro farmakologické použití kvůli toxikologickým dopadům [46, 48].

PŘÍRODNÍ:

Exogenní – Antioxidanty, které jsou do organismu přijímány zvenčí.

- **Vitamíny** – C, E, A, D, B₂
- **Stopové prvky** – Se, Zn, Cu, Fe, Mn
- **Karotenoidy** – α -karoten, β -karoten, lutein, lykopen
- **Polyfenoly** – flavony, flavanoly, flavanony, kyselina fenolová [48, 49]

Endogenní – Antioxidanty, které jsou vytvářeny v organismu.

- **Enzymatické** – superoxiddismutáza (SOD), kataláza (CAT)
- **Neenzymatické** – glutathion (GSH), feritin, albumin, bilirubin [48, 49]

SYNTECKÉ:

Fenolická struktura

- **Butylhydroxyanisol (BHA)**
- **Butylhydroxytoulén (BHT)**
- **Terciální butylhydrochinon (TBHQ)** [48, 49]

Nano antioxidanty

- **Kovové nanočástice**
- **Oxidy** [48]

1.3.5 Hlavní metody stanovení antioxidační aktivity

K testování antioxidačních schopností se nejčastěji používají spektroskopické, biochemické a elektrochemické metody, které bývají upravovány tak, aby dokázaly posoudit potenciál antioxidantů a zároveň byly variabilní vzhledem k působení jejich mechanismů. Obvykle jsou založeny na reakci vychytávání volných radikálů nebo zabraňují jejich vzniku použitím vhodných antioxidantů [48].

Elektrochemické metody

Mezi základní metody této skupiny se řadí cyklická voltametrie, amperometrie a biamperometrie. Tyto metody se často používají především pro jejich citlivost, rychlost a finanční nenáročnost [43].

- **Cyklická voltametrie**

Metoda je založena na měření oxidačního potenciálu $E_{1/2}$. Potenciál pracovní elektrody je v čase lineárně snímán od počáteční hodnoty po konečnou hodnotu a zase nazpět. Nízké hodnoty oxidačního potenciálu odrážejí tendenci molekuly darovat elektron a poukazují na významnou antioxidační kapacitu [43, 44].

- **Amperometrie**

Principem této metody je měření protékajícího proudu mezi pracovní a referenční elektrodou, přičemž je na pracovní elektrodu vkládán konstantní potenciál. Stanovení antioxidační aktivity pak probíhá díky redukci 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH) na elektrodě ze skelného uhlíku [43, 44, 50].

- **Biamperometrie**

Jedná se o metodu, která pro svá měření používá dvě identické polarizované elektrody s vysokou citlivostí. Princip měření je založen na reakci analytu (antioxidantu) s oxidovanou formou redoxního páru, při níž se sleduje rozdíl potenciálu (ΔE) mezi elektrodami [43, 44].

Spektrální metody (Viz kapitola 1.4)

- **UV/Vis spektrofotometrie**
- **Fluorescenční metody**

1.3.6 Další metody stanovení antioxidační aktivity

Chromatografické metody

Chromatografie zahrnuje širokou škálu použitelných metod, které se využívají pro separaci a detekci různorodých látek v analytu. Zároveň lze pomocí těchto metod stanovit antioxidační kapacitu. Mezi nejvíce používané metody se řadí plynová chromatografie a vysokoúčinná kapalinová chromatografie [43].

- **Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

Je to metoda sloužící k separaci, identifikaci a kvantifikaci látek. Princip spočívá v separaci analytu na základě jeho afinity ke stacionární (pevné) fázi a mobilní (kapalné) fázi. Analyt proudí kolonou v mobilní (kapalné fázi) směrem do detektoru. K detekci se používají spektrometrické detektory (UV/Vis, DAD), hmotnostní spektrometrické, fluorimetrické a elektrochemické [43, 44].

- **Plynová chromatografie (GC)**

Principem se podobá metodě HPLC, metoda je založena také na separaci analytu mezi mobilní a stacionární fázi. V tomto případě je stacionární fázi kapalina nebo pevná fáze, kde se podle tohoto kritéria dělí na chromatografii plyn-pevná látka (GSC) nebo chromatografii plyn-kapalina (GLC). Mobilní fázi tvoří nosný plyn, nejčastěji se používá dusík, helium a vodík. V detektoru dochází k interakci molekul, která je převedena na elektrický signál, ze kterého následně vzniká chromatogram. I u této metody se využívá široká škála detektorů, jako např. plamenové ionizační, plamenové fotometrické, tepelně vodivostní atd [44, 51].

1.4 SPEKTRÁLNÍ METODY

Jedná se o soubor analytických metod, kdy je předmětem jejich studia interakce látek s elektromagnetickým zářením. Z množství absorbovaného nebo emitovaného záření lze získat informace o jednotlivých energetických hladinách. Historicky první analytické metody využívaly pro svá měření pouze viditelnou oblast elektromagnetického záření. Dnes se již využívá celé spektrum (Obr. 9) od rentgenového záření po rádiové vlny. Jako spektrum částice vzorku se pak označuje naměřená závislost intenzity sledované veličiny na vlnové délce, vlnočetu nebo energii [52, 53].

Obecně lze spektrální metody rozdělit do dvou skupin:

- **Absorpční** – metody založené na měření propustnosti, absorptanci a absorbanci monochromatického záření sledovanou soustavou částic [52].
- **Emisní** – metody založené na kvalitativní a kvantitativní analýze vzorku z emisního spektra [52].

1.4.1 Elektromagnetické záření

Představuje typ záření, které se chová jako příčné vlnění. Je složeno ze dvou proměnných silových složek – elektrické a magnetické. Jejich vektory jsou vždy navzájem kolmé. Nosiče energie elektromagnetického pole představují fotony. Rychlost, jakou fotony přenášejí energii homogenním prostředím, je stálá a ve vakuu činí $c = 2,99793 \cdot 10^8$ m/s. Kvantum energie přenášené jedním fotonem je úměrné frekvenci (Rovnice 1) [52].

$$E = h \cdot \nu$$

Rovnice 1: Výpočet energie [52]

E...energie fotonu

h...Planckova konstanta ($6,6262 \cdot 10^{-34}$ J.s)

ν ...frekvence elektromagnetického záření

Zářivou energii lze také definovat pomocí vlnové délky λ (Rovnice 2), která spolu s frekvencí vyplývá z vlnové povahy elektromagnetického záření.

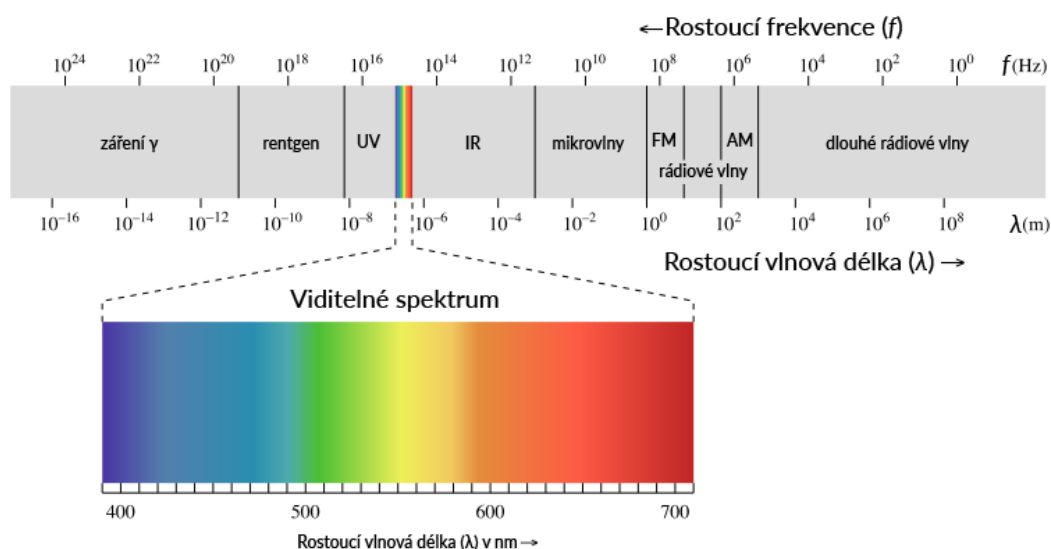
$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

Rovnice 2: Výpočet frekvence [52]

ν ...frekvence elektromagnetického záření

λ ...vlnová délka

c...látková koncentrace absorbující látky



Obrázek 9: Rozmezí oblastí elektromagnetického záření [54]

1.4.2 UV/Vis Spektrofotometrie

Jelikož se tato metoda řadí mezi spektrální metody, je i její princip postaven na interakci elektromagnetického záření a hmoty. Měření v oblastech UV a Vis (Obr. 9) probíhá v rozmezí vlnových délek 190 až 800 nm. Pokud působí elektromagnetické záření na hmotu, dochází k selektivní absorpci. Látka tedy pohlcuje určitou část záření o různých vlnových délkách. Množství pohlceného světla udává veličina zvaná absorbance. Výsledkem měření jsou tzv. absorpční spektra, která představují graficky vyjádřenou závislost absorbance na vlnové délce. Základem pro kvantitativní analýzu je závislost absorbance na koncentraci stanovované látky a délce použité kyvety (Rovnice 3). Tento vztah popisuje tzv. **Lambertův-Beerův zákon** [52, 55, 56].

$$A = \varepsilon * l * c$$

Rovnice 3: Výpočet absorbance dle L-B zákona [55]

A ... absorbance

ε ... molární absorpční koeficient

l ... délka kyvety

c ...látková koncentrace absorbující látky

Dále lze absorbanci charakterizovat dle vztahu (Rovnice 4):

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Rovnice 4: Výpočet absorbance [55]

I_0 ... intenzita záření vstupující do vzorku

I ...intenzita záření, která prošla vzorkem a vystupuje z něj

Kromě absorpance lze také měřit propustnost neboli transmitanci (Rovnice 5, 6). Ta popisuje množství světla určité vlnové délky, které prošlo vzorkem [55].

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Rovnice 5: Výpočet transmitance [55]

T...transmitance

Lze také:

$$T(\%) = 100 \frac{I}{I_0}$$

Rovnice 6: Přepočet transmitance na % [55]

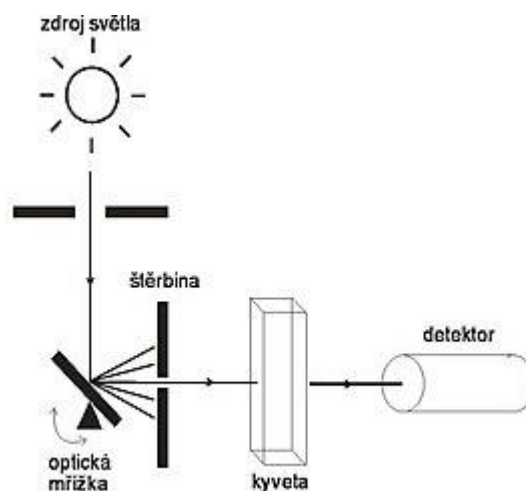
Transmitanci a absorpanci (Rovnice 7) lze mezi sebou vzájemně přepočítávat dle vztahu [52]:

$$A = -\log T$$

Rovnice 7: Přepočet absorpance a transmitance [52]

Spektrofotometr

Spektrofotometr je měřicí zařízení pro kvantitativní analýzu obecně používané k charakterizaci chemických látek stanovením množství světla, které je částečně absorbováno analytem přítomným v roztoku. Mohou být klasifikovány podle spektrální oblasti, jako je ultrafialový spektrofotometr (UV), od 190 nm do 380 nm; viditelný spektrofotometr (Vis), od 380 nm do 750 nm. Dnes již představují spektrofotometry standardní vybavení laboratoře. Existují ve dvou uspořádání, a to v jednopaprskovém a dvoupaprskovém. Každý spektrofotometr musí obsahovat následující součásti (Obr. 10) [56, 57]:



Obrázek 10: Schéma spektrofotometru [58]

- **Zdroj záření**

Jako zdroj záření pro viditelnou oblast lze použít např. wolframové nebo halogenové lampy. Nevýhodou wolframových lamp je jejich kratší životnost. Lze se tomuto problému vyvarovat použitím halogen-wolframové lampy, u které je životnost přibližně 2krát delší než u čistě wolframové. Pro UV oblast se potom využívají deuteriové nebo vodíkové výbojky. Pro obě zmiňované oblasti současně lze použít xenonové výbojky [52, 56].

- **Disperzní systém**

Tento systém je tvořen tzv. monochromátorem. Jedná se o zařízení, jehož hlavním úkolem je vybrat a přenést do vzorku jednu konkrétní vlnovou délku daného spektra. Monochromátor se skládá z výstupní šlěrbyny, z disperzního prvku (mřízka, hranol) a z pomocné optiky (čočka, zrcadla) [52, 56, 57].

- **Absorpční systém**

Absorpční systém vytváří roztok, který je uzavřený v kyvetě. Kyvety se vyrábějí z více druhů materiálu. Existují kyvety skleněné, plastové, křemenné. Plastové a skleněné jsou vhodnější pro použití ve Vis oblasti, naopak pro UV oblast se používají křemenné kyvety [52, 56].

- **Fotometrický systém**

Hlavním úkolem fotometrického systému je převod energie světelného záření na elektrický signál. Tuto funkci vykonávají detektory. Detektory nejčastěji využívané ve spektrofotometrii jsou fotodiody, fotočlánky, fotonásobiče a soustavy fotodiod [52, 56, 57].

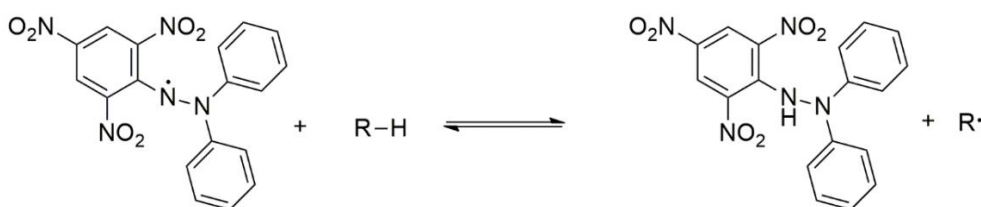
Využití UV/Vis spektrofotometrie:

Tato metoda se využívá v kvantitativní analýze především pro stanovování složek, které jsou přítomné v nízkých koncentracích. Metodu lze využít také v kvalitativní analýze. Lze díky ní analyzovat látky anorganické i organické. Obecně se využívá v oblasti biochemie, lékařství, potravinářství a ekologie. Metoda je oblíbená především pro své snadné používání, finanční nenáročnost a dostatečnou citlivost [55, 56].

1.4.3 Spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity

- **DPPH test**

Je to test založený na schopnosti purpurového, stabilního volného radikálu 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylu reagovat s donory vodíku (Obr. 11). DPPH test je při reakci s donory vodíku selektivnější než $ABTS\cdot^+$ (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina). Při tomto testu se využívá sloučeniny DPPH, která je v metanolovém roztoku v barevné radikálové formě. Radikál je rozpustný v mnoha organických rozpouštědlech, ovšem ve vodě je nerozpustný. DPPH• a vykazuje silnou absorpci v UV/VIS spektru. Radikál DPPH• po reakci s antioxidantem nebo radikálem poskytuje redukovanou formu DPPH (hydrazinová forma), která má za následek změnu barvy z fialové na světle žlutou. Tato změna se měří spektrofotometricky při 517 nm. Jako standart lze použít Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), kyselina gallová a epikatechin. Určuje se množství standardu, které je ekvivalentní redukční účinnosti testovaného vzorku [42–44, 59].

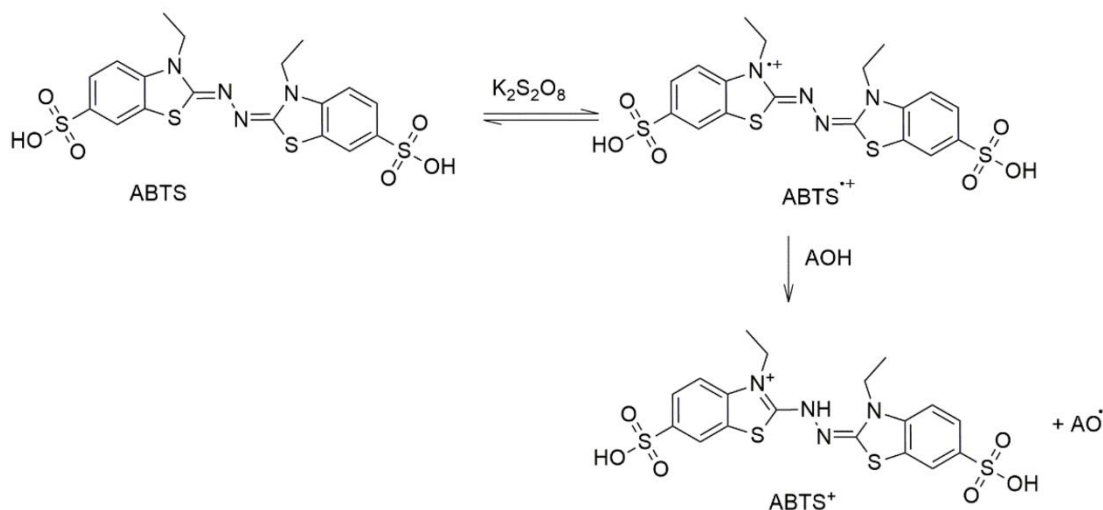


Obrázek 11: Reakce radikálu DPPH s donorem vodíku [43]

- **ABTS test**

Principem tohoto testu je inaktivace radikálového kationtu $ABTS^{\bullet+}$. Tento radikál vzniká oxidací kyseliny 2,2'-azino-(bis-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonová), kde je aktivačním činidlem AAPH 2,2'-azobis-(2-amidino-propan) dihydrochlorid, H_2O_2 v přítomnosti peroxidázy, hexakynoželeznatanu tetrdraselného $K_4[Fe(CN)_6]$ či peroxidisíranu draselného $K_2S_2O_8$ (Obr. 12). Radikál se barví do modro-zelena a má silnou absorbanci ve viditelné oblasti 600 až 750 nm. Jeho maximální absorpance činí 734 nm. Antioxidační aktivita tak může být snadno stanovena spektrofotometricky. Test je vhodný pro měření hydrofilních a lipofilních antioxidantů [42–44, 59].

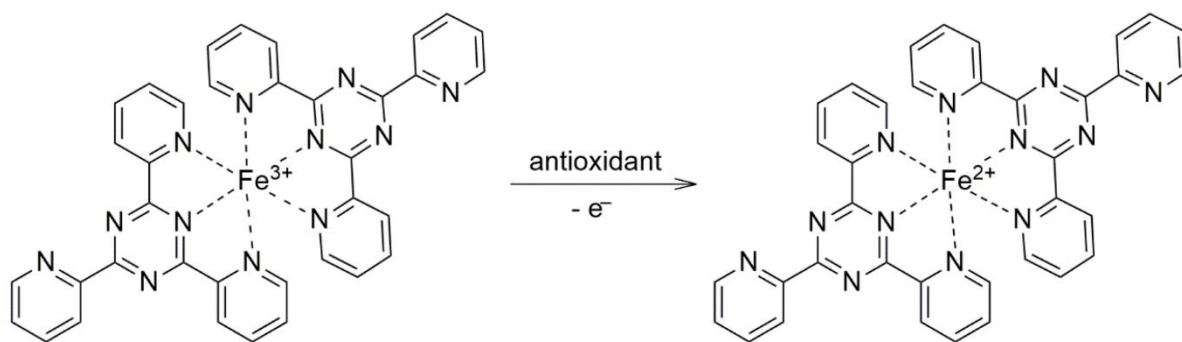
Metoda TEAC vyjadřuje počet radikálových kationtů $ABTS^{\bullet+}$ inaktivovaných jednou molekulou antioxidantu. Stanovení TEAC je závislé na čase inkubace a také na poměru množství vzorku a koncentrace $ABTS^{\bullet+}$ [42].



Obrázek 12: Vznik radikálu $ABTS^{\bullet+}$ a následná reakce s antioxidantem [43]

- **FRAP test**

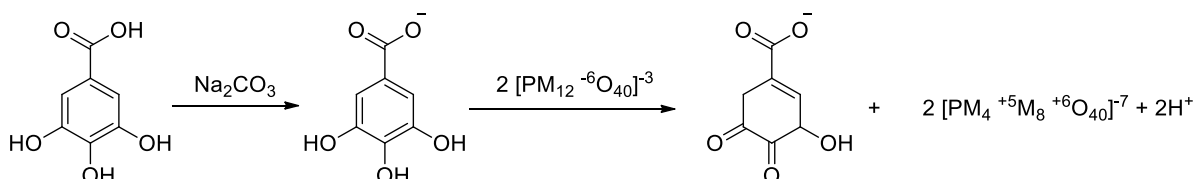
Tato metoda je založena na redukcí železitých komplexů (Obr. 13) např. TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazinu) s hexakynoželezitanem draselným $K_3[Fe(CN)_6]$ nebo chloridem železitým $FeCl_3$, které jsou téměř bezbarvé a po redukcí se tvoří modře zbarvený železnatý komplex ($\lambda=593$ nm). Tato metoda se provádí v podmínkách kyselého pH (3,6), aby došlo k zachování rozpustnosti železa. Jako standartní roztok lze využít kyselinu askorbovou [42, 44, 59].



Obrázek 13: Redukce železitého komplexu [43]

- **Folin-Ciocalteu test**

Jedná se o známou metodu, která se používá pro stanovení celkového obsahu fenolů (TPC). Princip je založen na redukci Folin-Ciocalteuova činidla fenolickými sloučeninami v alkalickém stavu (Obr. 14). Činidlo se skládá ze směsi kyseliny fosfomolybdenové a kyseliny fosfowolframové, ve které jsou molybden a wolfram v oxidačním stavu 6^+ a během reakce jsou redukovány na oxidační stav 5^+ . Redukce je doprovázena změnou barvy z původní žluté na modrou barvu, což je způsobeno tvorbou komplexů s fenoly. Absorbance se obvykle měří v rozsahu od 750 do 765 nm [43, 44, 60].



Obrázek 14: Reakce fenolických sloučenin s kyselinami v alkalickém prostředí [44]

1.4.4 Fluorimetrické stanovení antioxidační aktivity

Fluorimetrie je analytická metoda zabývající se fluorescencí, která představuje druh luminiscence. Řadí se mezi fotoluminiscenční metody, které jsou založené na využití emisních spekter molekul v oblasti ultrafialového, a především viditelného záření. Tato spektra vznikají deaktivací molekul předem excitovaných absorpcí záření v téže spektrální oblasti. Dalším zástupcem řadí se mezi tyto metody je fosforimetrie, jejíž předmětem měření je fosforescence. Hlavní rozdíl mezi těmito typy luminiscence je jejich rozdílná doba dosvitu. Je-li trvání excitovaného stavu přibližně 10^{-7} s jedná se o fluorescenci. Pokud mezi excitací a emisí uplyne delší čas, jedná se o fosforescenci [52, 55].

- **ORAC test**

Neboli test absorpční kapacity kyslíkových radikálů, je metoda založená na tvorbě peroxylových radikálů, které jsou indukované AAPH 2,2'-azobis-(2-amidino-propan) dihydrochlorid. Antioxidační aktivita se měří stanovením ztráty fluorescence, přičemž fluorescein se obvykle používá jako sonda. Jako referenční sloučenina se využívá standardní antioxidant, typicky trolox, a hodnoty ORAC hodnocených antioxidantů jsou popsány jako ekvivalent Troloxu [43, 44].

- **HORAC test**

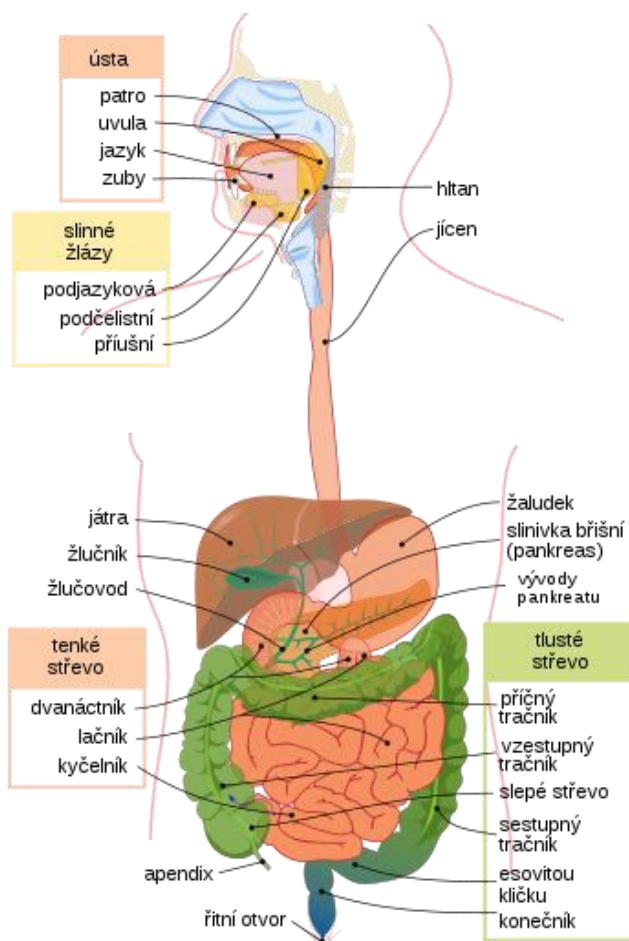
Tato metoda je založena na oxidaci fluoresceinu hydroxylovými radikály, které jsou generovány pomocí Fentonova činidla. Jako standardní roztok se např. využívá kyselina gallová [43, 44].

- **TRAP test**

Jedná se o antioxidační parametr pro zachycení peroxylových radikálů. Princip této metody spočívá v schopnosti antioxidantů inhibovat reakci mezi peroxylovými radikály a cílovou molekulou. Jako zdroj radikálu se používá 2,2'-azobis-(2-amidino-propan) dihydrochlorid (AAPH) anebo 2,2'-diazobis(2-methylpropionamidin) dihydrochlorid (ABAP). Metoda TRAP se řadí mezi luminiscenční metody, pro stanovení indexu TRAP se využívá luminol a pyranin, které slouží jako cílové molekuly [43, 44, 61].

1.5 GASTROINTESTINÁLNÍ TRAKT (GIT)

Neboli trávicí soustava, zahrnuje orgány (Obr. 15), jejichž hlavním úkolem je mechanicky a enzymaticky trávit požitou potravu, vstřebávat z ní potřebné živiny a vodu, chránit organismus před nákazou patogeny a v neposlední řadě vyloučit přebytečnou potravu a toxické látky ve formě výkalů. GIT je u dospělého jedince dlouhý přibližně 9 m [62, 63].



Obrázek 15: Schéma lidské trávicí soustavy [64]

1.5.1 Vymezení gastrointestinálního traktu

Horní část GIT

- **Ústní dutina**

Trávení potravy začíná v ústech. Zde se nachází zuby, jazyk (obsahující chuťové pohárky) a slinné žlázy. V ústech dochází ke primárnímu zpracování pomocí mechanismů žvýkání a slinění potravy [65, 66].

- **Hltan**

Tento orgán lze rozdělit do 3 částí: nosohltan, ústní část a dolní hrtanový oddíl. Hltan navazuje na jícen, proudí přes něj vzduch a potrava [66].

- **Jícen**

Představuje trubicovitý orgán, který spojuje hltan se žaludkem. Je dlouhý přibližně 23 až 28 cm a jeho hlavní funkcí je pomocí peristaltiky posouvat potravu směrem do žaludku [62, 65, 66].

Dolní část GIT

- **Žaludek**

Jedná se o vakovitý, rozšířený orgán, který je anatomicky rozdělen do 4 hlavních částí: *cardie*, *fundus*, *corpus* a *antrum*. Mezi jeho hlavní funkce se řadí skladování, míchání, mletí a vyprazdňování. Žaludek je prvním místem trávicí soustavy, kde dochází k významnému chemickému zpracování potravy. Na žaludek navazuje část tenkého střeva zvaná dvanáctník [65, 66].

- **Tenké střevo**

Skládá se anatomicky ze 3 částí: dvanáctník, lačnick a kyčelník. Hlavním úkolem tohoto orgánu je trávení a vstřebávání živin z potravy. Přičemž většina trávicího procesu se odehrává ve dvanáctníku, vstřebávání živin pak probíhá ve zbylých dvou částech tenkého střeva. Sliznice tenkého střeva se skládá z 5 až 8 mm vysokých řas. Povrch střeva vytvářejí tzv. klky, což jsou vysoké výběžky sliznice, které výrazně zvětšují resorpční povrch [65, 66].

- **Tlusté střevo**

Vakovitě rozšířená část tlustého střeva, která navazuje na kyčelník se nazývá slepé střevo, v kterém se nachází velké množství endokrinních žláz. Dále navazuje tzv. tračník, který je složen z 5 částí: vzestupný tračník, příčný tračník, sestupný tračník, esovitý tračník a konečník. Tlusté střevo je zodpovědné za absorpci vody, sodíku a chloridů, vylučuje draslík a hydrogenuhličitan. Součástí střevní mikroflóry jsou převážně bakterie *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* a bakterie z rodu *Lactobacillus*. Tyto mikroorganismy napomáhají při trávení a zajišťují obranyschopnost. Bakterie tlustého střeva také produkují vitamín B12 a K. Poslední část pak tvoří konečník, který působí jako dočasné skladování stolice před tím, než je vyprázdněna análním kanálem [62, 66].

- **Játra**

Játra jsou nepárový orgán a představují největší žlázu lidského těla. Jejich hmotnost činí asi 1,5 kg. Játra jsou hlavním místem metabolismu léčivých přípravků a jiných exogenních sloučenin. Hlavními funkcemi jater je metabolismus cukrů, tuků a bílkovin, sekrece žluči a depotizace vitaminů [66, 67].

- **Žlučník**

Jedná se o nepárový orgán hruškovitého tvaru, jehož kapacita činí přibližně 60 až 80 ml žluči. Žlučník je s játry spojen pomocí řídkého vaziva. Žluč vstupuje také do dvanáctníku a hraje specifickou roli při trávení lipidů, emulgací dietních tuků do malých kapiček [65, 66].

- **Slinivka břišní**

Označována jako *pankreas*, je žláza s vývodem do dvanáctníků. Tento orgán je dlouhý přibližně 15 cm a 5 cm široký. Slinivka odvádí jako žláza dvě důležité funkce: endokrinní a exokrinní sekreci. Exokrinní žláza má stavbu odpovídající svatbě slinné žlázy a ústí do dvanáctníku. Endokrinní žláza vytváří několik typů buněk. Tzv. buňky A vylučují glukagon, který se účastní metabolismu cukrů. Buňky B produkují inzulin, který snižuje hladinu cukru v krvi. A buňky D, které tvoří hormony jako gastrin a somatotropin [66].

1.5.2 Biochemický obsah trávicích šťáv v gastrointestinálním traktu

- **Sliny**

V ústní dutině dochází k primárnímu zpracování potravy pomocí slin. Sliny představují biologickou tekutinu, která je produkována slinnými žlázami, přičemž její obsah tvoří asi 98 až 99% voda, 0,3 % bílkoviny a 30 druhů enzymů. K hlavním skupinám slinných proteinů jsou řazeny muciny, slinná amylasa, proteiny bohaté na prolin, cystatiny, statherin, histatiny a karboanhydrasa. Dále slina obsahuje významné elektrolyty jako je sodík, draslík, vápník, hořčík, fosfát a hydrogenuhličitan [65, 68].

- **Žaludeční šťávy**

Žaludek denně vyprodukuje okolo 2 až 3 l žaludečních šťáv. Tyto šťávy jsou tvořeny kyselinou chlorovodíkovou, solemi, mucinem, vodou a trávicími enzymy. Mezi významné žaludeční enzymy patří pepsin a lipáza. Hlavní buňky, vyskytující se v žaludku, vylučují prekurzor pepsinogen, který je po kontaktu s kyselinou přeměněn na pepsin. Tyto buňky vylučují také

lipázu, která je zodpovědná za hydrolyzu triglyceridů v potravě. Všechny výše zmíněné složky udržují v žaludku stabilní kyselé prostředí, jehož pH se pohybuje okolo hodnoty 2 [65, 69].

- **Střevní šťávy**

Hlavní složení těchto šťáv tvoří pankreatické enzymy složené z proteáz, amyláz a lipáz. Dále jsou tvořeny také ostatními enzymy, které produkuje vnitřní stěna tenkého střeva. Pankreas vylučuje hydrogenuhličitan do dvanáctníku, aby udržel pH tenkého střeva kolem 6 až 7, což je vhodné pro tyto enzymy k trávení tuků, sacharidů a bílkovin [65].

1.5.3 Statické a dynamické modely trávení *in vitro*

Lidské trávení představuje komplikovaný proces, který moduluje fyzikální, chemické a funkční vlastnosti živin a bioaktivních sloučenin. Experimenty na lidech nejsou vždy finančně, technologicky a eticky proveditelné. Proto modely *in vitro* trávení, které simulují fyzikální a biochemické podmínky lidského gastrointestinálního traktu, získaly na popularitě. Jsou rychlé, mají nízké náklady a nemají žádná etická omezení [70].

Statický model *in vitro* je populární pro svou jednoduchost a vysokou propustnost. Mezi široce využívaný statický model patří INFOGEST. Trávení ve statických modelech probíhá v jediném stacionárním bioreaktoru, kde se akumulují trávicí produkty pomocí rotace anebo třepání. Ve statických modelech se trávicí enzymy a elektrolyty zpracovávají v dávkách, ale fyziologické parametry se v průběhu času nevyvíjejí. Proto není schopen reprodukovat tranzitní poměr substrát-enzym, pH profily a transport trávicích produktů, které jsou rozhodující pro odhad trávicího osudu živin a bioaktivních sloučenin [65, 70].

V posledních letech proto stoupla poptávka po dynamických modelech *in vitro*. Tyto modely umožňují progresivní trávicí sekreci, vývoj pH a lumenální tranzit, které jsou rozhodující pro strukturální a chemické změny v potravinách. Zejména dynamické modely simulují pohyb střev a výsledné mechanické síly a hydrodynamické podmínky, které podstatně formují časové fyzikální a chemické prostředí při trávení *in vitro*. V posledních desetiletích bylo vyvinuto hned několik metod jako např. TIM, SHIME, SIMGI, ESIN, GSM atd. Stěžejní u těchto modelů je správné naprogramování klíčových informací jako je např. poločas vyprazdňování žaludku nebo změna pH [65, 70, 71].

2 CÍL PRÁCE

- 1) Experimentálně stanovit vliv *in vitro* trávicího procesu na antioxidační vlastnosti vzorku houby.
- 2) Výsledky přehledně zpracovat a diskutovat s dostupnou literaturou.
- 3) Uvést, zda přítomnost trávicích enzymů má vliv na antioxidační vlastnosti.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 POUŽITÁ ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY

Dvoupaprskový UV-Vis spektrometr UV-2600 (Shimadzu, Japonsko), Ultrazvuková lázeň Bandelin SONOREX (Schalltec GmbH, Německo), Zkumavky Eppendorf, Třepačka VWR® Tube Rotator, VWR Interantional, s. r. o, Česká republika), Centrifuga ST4R-Plus MD, Sorvall, Thermo Scientific, MA, USA, Běžné laboratorní vybavení.



Obrázek 16: Použitý vzorek houby *Cordyceps sinensis* [72]

3.2 NAVÁŽKY VZORKU

Vzorek byl navážen vždy z obsahů dvou kapslí *Cordyceps sinensis* (Obr. 16), přičemž jedna kapsle obsahovala přibližně 0,5 g houbového extraktu.

3.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

Pro přípravu roztoků byl použit postup dle (73) s mírnou modifikací.

3.3.1 Příprava roztoků slin

Bylo naváženo 1,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,038 g KH_2PO_4 a 1,6 g NaCl do 200 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Následně bylo upraveno pH na 6,75 s využitím 5,0 M HCl. Poté bylo přidáno 8,0 g α -amylázy.

3.3.2 Příprava roztoků žaludečních šťáv

Bylo naváženo 0,024 g pepsinu (2500 U/mg pevného podílu) do 200 ml odměrné baňky a doplněno po rysku 0,03 M HCl. Poté bylo upraveno pH na 1,2 s využitím 5,0 M HCl.

3.3.3 Příprava roztoku střevních šťáv

Bylo naváženo 0,2857 g pankreatinu (4xUSP) a 1,7144 g žlučového extraktu do 200 ml odměrné baňky a doplněno po rysku 0,1 M NaHCO_3 .

3.4 ÚPRAVA VZORKU

Jednotlivé úpravy vzorku s příslušnými názvy jsou popsány v schématu (Obr. 17).

3.4.1 Extrakce vzorku methanolem

Methanolová extrakce byla provedena podle postupu dle (73) s mírnou modifikací. Byl navážen obsah dvou kapslí vzorku do uzavíratelné zkumavky, poté bylo přidáno 10 ml 80 % methanolu. Zkumavka byla umístěna do ultrazvukové lázně po dobu 15 minut a následně uchována v temném prostředí. Poté byl vzorek centrifugován na 15 minut při 5000 rpm. Vzniklý supernatant byl napipetován do zkumavek Eppendorf a uchováván při -18°C . Tento postup byl zopakován 2krát.

3.4.2 Úprava vzorků pomocí trávicích šťáv – proces *in vitro*

Pro úpravu vzorků byl použit postup dle (73) s mírnou modifikací. Nejprve byl navážen obsah dvou kapslí vzorku do plastové uzavíratelné zkumavky, poté bylo přidáno 7,0 ml slinného roztoku a směs se dala na 10 minut inkubovat při teplotě 37°C ve tmě za stálého třepání. Poté se upravilo pH na 1,2 s využitím 5,0 M HCl. Následně se přidalo 5,0 ml roztoku žaludečních šťáv a nechalo se inkubovat za stálého třepání ve tmě 120 minut při 37°C . Poté se upravilo pH na 7,0 s využitím 1,0 M NaOH a následně se přidalo 5,0 ml roztoku střevních šťáv, 2 ml 0,12 M

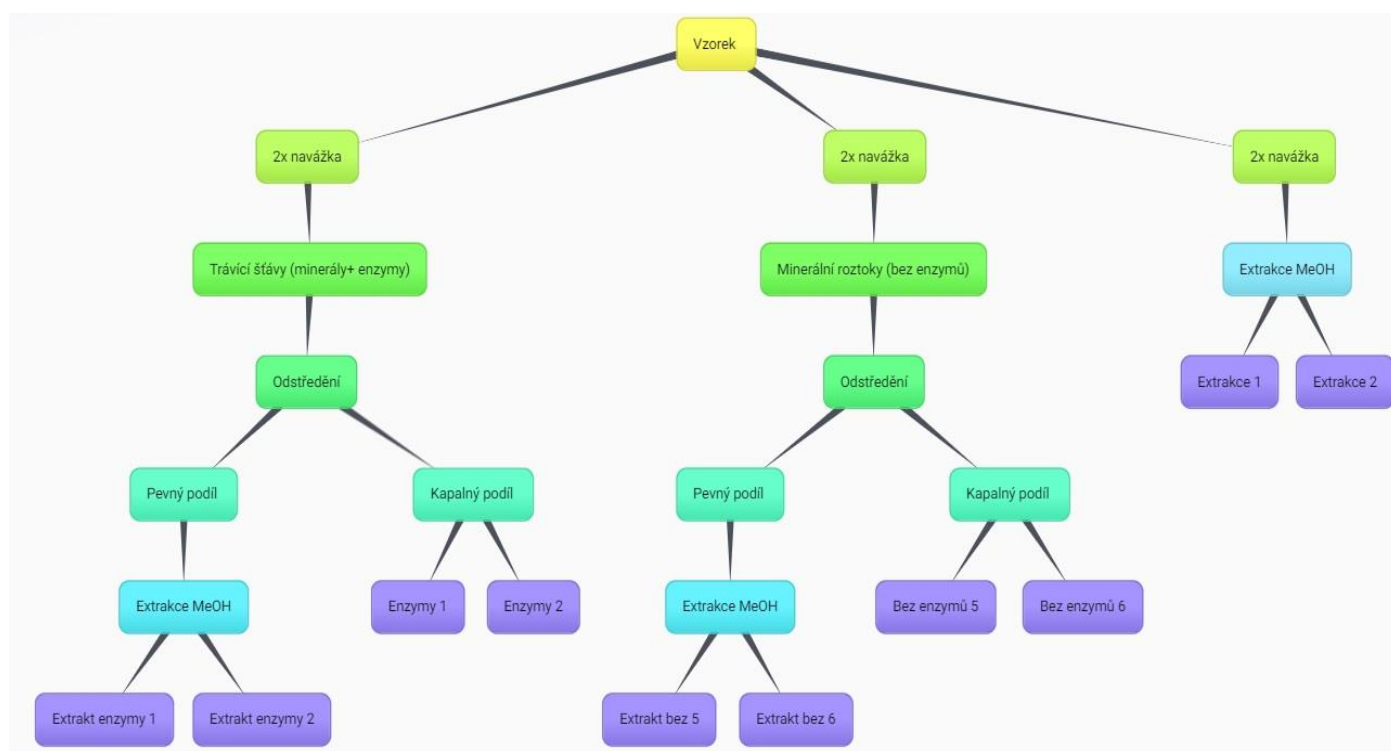
NaCl a 2 ml 0,12 M KCl. Roztok se nechal inkubovat po dobu 120 minut při teplotě 37 °C ve tmě za stálého třepání. Po skončení inkubace se zkumavka se směsí vložila do centrifugy na 15 minut při 5000 rpm, a poté byl supernatant napipetován do zkumavek Eppendorf a uchováván při -18°C. Tento postup byl zopakován pro všechny vzorky 2krát a také pro slepý pokus, který byl připraven stejným způsobem jen bez vzorku.

3.4.3 Úprava vzorku pomocí minerálních roztoků

Celý postup byl proveden totožně jako u procesu s trávicími šťávami. V tomto případě však byly použity pouze minerální roztoky, které neobsahovaly dané enzymy.

3.4.4 Extrakce pevného podílu po předchozí extrakci

Po důkladném odpipetování supernatantu bylo k pevnému podílu do zkumavky přidáno 10 ml 80 % methanolu. Zkumavka byla následně umístěna do ultrazvuku po dobu 15 minut. Poté byla zkumavka vložena do centrifugy na 10 minut při 5000 rpm. Vzniklý supernatant byl napipetován do zkumavek Eppendorf a uchován při -18°C. Tento pokus byl zopakován 4krát pro všechny vzorky.



Obrázek 17: Přehled úprav a názvů vzorků [72]

3.5 POSTUPY MĚŘENÍ PRO JEDNOTLIVÉ METODY

3.5.1 Metoda FRAP

Pro metodu FRAP byl použit postup dle (74) s mírnou modifikací. Nejdříve byla připravena směs, která obsahovala 20 mM FeCl₃, 10 mM roztok TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazin) ve 40 mM HCl a 0,3 M octanový pufr o pH 3,6. Jednotlivé roztoky byly smíchány v poměru 1 : 1 : 10. 3,0 ml této směsi byly napipetovány do skleněné zkumavky s víčkem a dále bylo přidáno 300 µl naředěného extraktu vzorku. Naředěny 10krát byly vzorky: Extrakce 1, Extrakce 2, Enzymy 1, Enzymy 2, Bez enzymů 5 a Bez enzymů 6. Ostatní vzorky byly použity bez ředění. Inkubace probíhala 45 minut při laboratorní teplotě v temnu. Poté byla změřena absorbance při 593 nm. Slepý pokus obsahoval destilovanou vodu místo extraktu. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent Troloxu (mg/g sušiny vzorku).

3.5.2 Metoda ABTS

Postup metody byl proveden dle (75) s mírnou modifikací. Byl připraven zelený roztok radikálu ABTS^{•+} reakcí diamoniové soli ABTS s peroxidisíranem draselným. Příprava tohoto roztoku spočívala v rozpuštění tablety ABTS (10 mg) v 5 ml destilované vody, následně bylo k roztoku přidáno 100 µl 0,064 mol/l roztoku peroxidisíranu draselného a dále byl roztok doplněn po rysku destilovanou vodou na objem 200 ml. Tato směs reagovala při laboratorní teplotě po dobu 12 až 16 hodin.

Pro stanovení byly napipetovány 3 ml roztoku ABTS^{•+} do zkumavky s víčkem a bylo přidáno 500 µl extraktu vzorku, v tomto případě byly 100krát naředěny tyto vzorky: Extrakce 1, Extrakce 2, Enzymy 1, Enzymy 2, Bez enzymů 5 a Bez enzymů 6. Zbylé vzorky byly požitý bez ředění. Roztok byl dále ponechán 60 minut v temnu při laboratorní teplotě. Po uplynutí tohoto času byl sledován úbytek absorbance při vlnové délce 734 nm. Souběžně s každým stanovením byl proveden slepý pokus, kde místo extraktu bylo přidáno čistě extrakční činidlo. Stanovený úbytek absorbance byl přepočítán na procenta inhibice roztoku a výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent Troloxu.

3.5.3 Metoda Folin-Ciocalteu

Pro metodu Folin-Ciocalteu byl použit postup dle (74) s mírnou modifikací. Nejprve byl do zkumavky s víčkem napipetován 1 ml extraktu, naředěny 10krát byly vzorky Extrakce 1 a Extrakce 2, dále byly 5krát ředěny vzorky Enzymy 1, Enzymy 2, Bez enzymů 5 a Bez enzymů 6. Zbylé vzorky byly použity bez ředění. Následně byl přidán 1 ml 80 % methanolu, 5 ml

destilované vody a 0,5 ml činidla. Takto připravený roztok byl ponechán 5 minut v klidu. Po uplynulém čase stání byl přidán 1 ml 5 % roztoku Na₂CO₃ a zkumavky byly ponechány při laboratorní teplotě po dobu 60 minut. Po této době byla změřena absorbance při 765 nm. Stejným způsobem byl proměřen slepý pokus, který místo 1 ml extraktu obsahoval 1 ml extrakčního činidla. Koncentrace fenolických látek ve vzorku byla stanovena pomocí kalibrační řady s kyselinou gallovou.

4 VYHODNOCENÍ

4.1 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

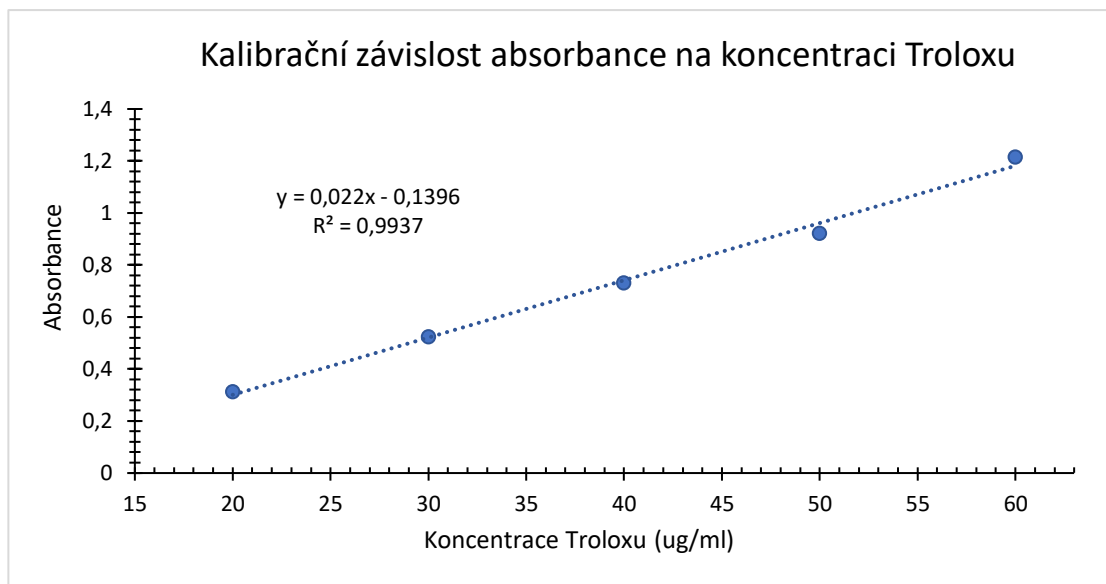
Antioxidační kapacita vzorku byla stanovena pomocí tří metod, jejichž postupy jsou popsány v kapitole 3.5.

4.1.1 Metoda FRAP

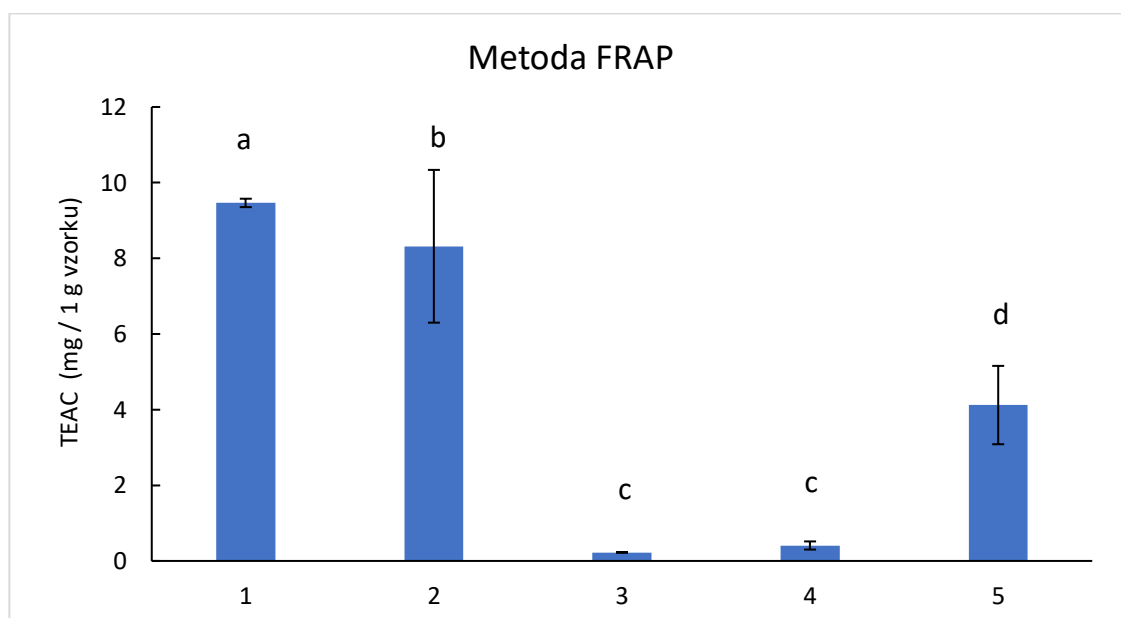
Mechanismus metody FRAP je založen na měření redukčních vlastností stanovovaných látek, které udávají antioxidační aktivitu.

Měření probíhalo při 593 nm, byly použity 3 ml reakční směsi a 300 µl extraktu vzorku nebo Troloxu (celý postup viz kapitola 3.5.1). Původně byl vzorek houby *Cordyceps sinensis* upraven 5 různými způsoby (Obr. 16), přičemž každý typ úpravy byl zastoupen dvěma vzorky. Celkem bylo tedy proměřeno 10 vzorků, pro které byla zaznamenána příslušná absorbance.

Následně bylo pomocí regresní přímky kalibračního grafu (Obr. 18) přepočítáno ekvivalentní množství Troloxu a jeho výsledný obsah byl vyjádřen jako mg Troloxu na 1 g vzorku. Poté byly v programu Microsoft Office Excel vypočítány aritmetické průměry pro jednotlivé vzorky a také byla spočítána směrodatná odchylka (N = 2). Následně byl vynesena graf (Obr. 19), ve kterém byla vyjádřena antioxidační aktivita v ekvivalentech Troloxu v jednotlivých vzorcích se směrodatnými odchylkami.



Obrázek 18: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci Troloxu [74]



Obrázek 19: Antioxidační aktivita jednotlivých vzorků pro metodu FRAP. 1 = trávící šťáva (minerály + enzymy); 2 = minerální roztok bez enzymů, 3 = pevný podíl z trávící šťavy (minerály + enzymy); 4 = pevný podíl (minerální roztok bez enzymů), 5 = extrakce MeOH. Stejná písmena nad sloupcem značí statisticky nevýznamný rozdíl ($p > 0.05$). Aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka ($N = 2$).

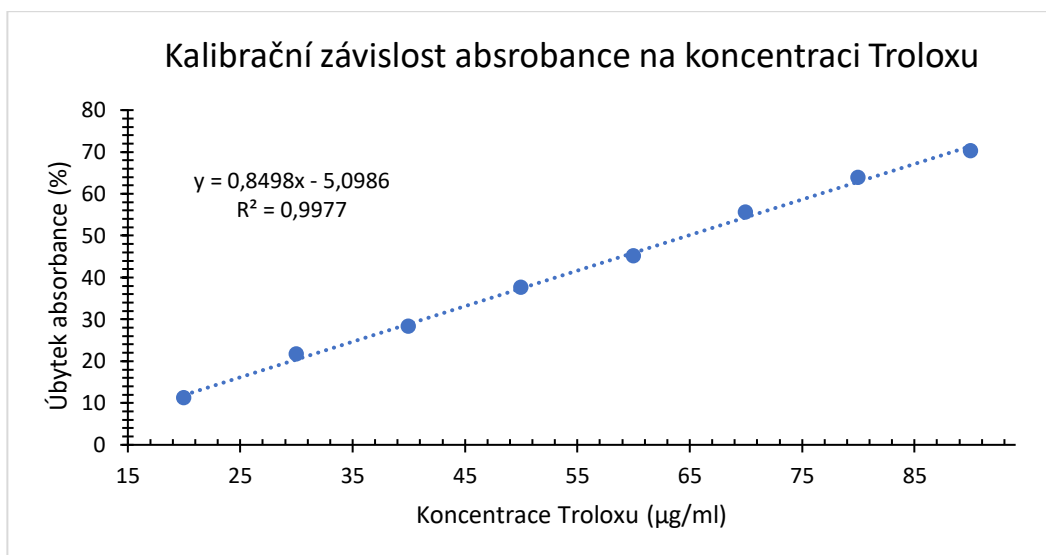
4.1.2 Metoda ABTS

U metody ABTS dochází k odbarvování roztoku, což vede k poklesu absorbance. Měří se tedy úbytek absorbance, který je potřeba přepočítat na % inhibice dle vztahu (Rovnice 8), kde A_0 je absorbance slepého vzorku, A_x je absorbance vzorku.

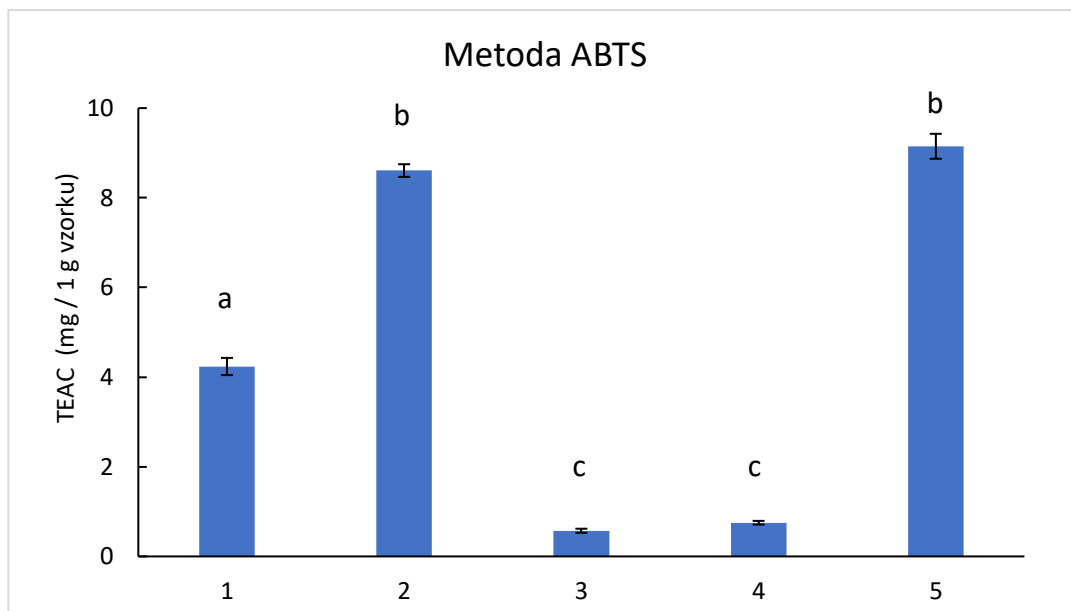
$$I (\%) = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \cdot 100$$

Rovnice 8: Výpočet úbytku absorbance v % [76]

Měření probíhalo při 734 nm a byly použity 3 ml roztoku ABTS^{•+} a 500 μ l extraktu vzorku (kapitola 3.5.2). Stejně jako u metody FRAP bylo i v tomto případě proměřeno 10 vzorků. Pro každý vzorek byla zaznamenána absorbance a změřen slepý pokus. Následně byla v programu Microsoft Office Excel přepočítána příslušná % inhibice dle vztahu (Rovnice 8). Pomocí regresní přímky kalibračního grafu (Obr. 20) byly vypočítány ekvivalentní koncentrace Troloxu pro jednotlivé vzorky, které byly vyjádřeny jako mg Troloxu na 1 g vzorku. Z těchto hodnot byly vypočítány aritmetické průměry daných vzorků a příslušné směrodatné odchylky ($N = 2$). Následně byl vynesena graf (Obr. 21) znázorňující koncentraci Troloxu v daných vzorcích se směrodatnými odchylkami.



Obrázek 20: Kalibrační závislost úbytku absorbance (%) na koncentraci Troloxu [73]

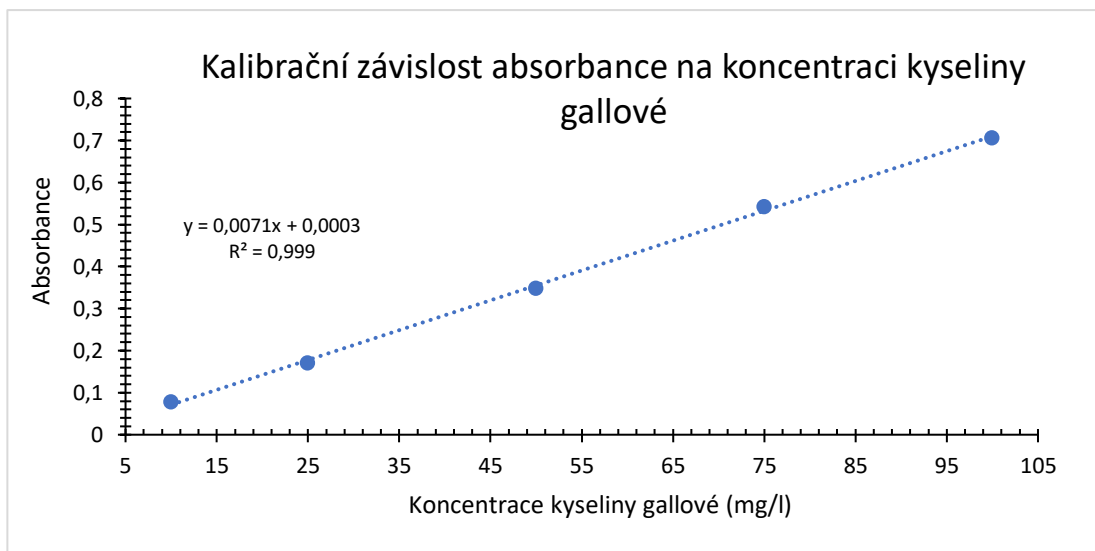


Obrázek 21: Antioxidační aktivita jednotlivých vzorků pro metodu ABTS. 1 = trávící šťáva (minerály + enzymy); 2 = minerální roztok bez enzymů, 3 = pevný podíl z trávící šťavy (minerály + enzymy); 4 = pevný podíl (minerální roztok bez enzymů), 5 = extrakce MeOH. Stejná písmena nad sloupcem značí statisticky nevýznamný rozdíl ($p > 0.05$). Aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka ($N = 2$).

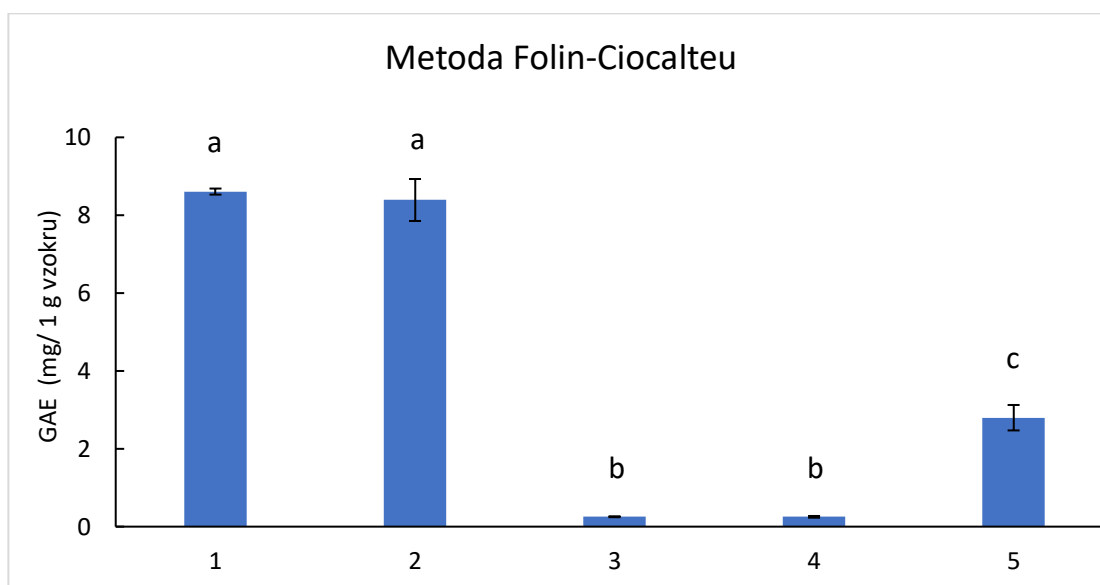
4.1.3 Metoda Folin-Ciocalteu

Princip metody je založen na reakci Folin-Ciocalteu činidla s fenolickými látkami obsaženými ve vzorku. Při reakci dochází k redukci a příslušné změně barvy.

Měření probíhalo při 765 nm, byla měřena směs obsahující 1 ml vzorku, 1 ml 80 % methanolu, 5 ml destilované vody, 0,5 ml činidla a 1 ml 5 % roztoku Na_2CO_3 (viz kapitola 3.5.3). Stejně jako v předešlých metodách bylo i zde proměřeno 10 vzorků a byla zaznamenána jejich absorbance. Z regresní přímky kalibračního grafu (Obr. 22) byly vypočteny výsledné obsahy fenolických látek, přepočítané na mg kyseliny gallové v 1 g vzorku. V programu Microsoft Office Excel byly vypočítány aritmetické průměry příslušných vzorků a směrodatné odchylky ($N = 2$). Na závěr byl vynesena graf (Obr. 23) závislosti kyseliny gallové v jednotlivých vzorcích s příslušnými směrodatnými odchylkami.



Obrázek 22: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci kyseliny gallové [73]



Obrázek 23: Antioxidační aktivita jednotlivých vzorků pro metodu Folin-Ciocalteu. 1 = trávící šťávy (minerály + enzymy); 2 = minerální roztok bez enzymů, 3 = pevný podíl z trávící šťávy (minerály + enzymy); 4 = pevný podíl (minerální roztok bez enzymů), 5 = extrakce MeOH. Stejná písmena nad sloupcem značí statisticky nevýznamný rozdíl ($p > 0,05$). Aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka ($N = 2$).

5 VÝSLEDKY A DISKUSE:

Metoda FRAP

Nejvyšší hodnoty TEAC vykazovaly vzorky po simulovaném *in vitro* trávení (9,46 mg TEAC/g) ve srovnání s chemickou extrakcí vzorku (ca 4,0 mg TEAC/g). Bohužel přítomnost enzymů v roztoku neměla pravděpodobně vliv na uvolnění látek s antioxidačním účinkem, protože podobnou antioxidační aktivitu vykazoval také roztok bez přítomnosti enzymů (8,32 mg TEAC/g).

Metoda ABTS

Antioxidační aktivita vzorku po chemické extrakci byla podobná jako extrakce do minerálního roztoku. Pouhou změnou pH a vyšší teplotou (37 °C) byly pravděpodobně extrahovány podobné látky jako v případě použití methanolického roztoku a ultrazvuku. Významně nižší antioxidační aktivita extraktu po *in vitro* trávení mohla být způsobena nedokonalým promícháním vzorku s trávicími šťávami. Na dně zkumavky se vytvořila nerozmíchaná sediment, která pravděpodobně zapříčinila neúplné rozpuštění vzorku.

Metoda Folin-Cicolteu

Nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity vykazovaly vzorky po simulovaném *in vitro* trávení (8,61 mg GAE/g) ve srovnání s chemickou extrakcí vzorku (ca 2,8 mg GAE/g). Přítomnost enzymů v roztoku, obdobně jako u metody FRAP, neměla pravděpodobně vliv na uvolnění látek s antioxidačním účinkem, protože podobnou antioxidační aktivitu vykazoval také roztok bez přítomnosti enzymů (8,39 mg GAE/g).

Diskuse

V mém experimentu byla antioxidační aktivita stanovená metodou FRAP (9,46 mg TEAC/g) vyšší než metodou ABTS (9,15 mg TEAC/g). Podobné výsledky byly získány v práci (77) ze vzorku houby rezavce štětinatého (*Inonotus hispidus*). V případě tohoto experimentu byla metodou ABTS stanovena antioxidační aktivita houby *Inonotus hispidus*, která činila $54,27 \pm 0,46$ mg TEAC/g vzorku. Totožně jako v mém případě experimentu byla antioxidační aktivita stanovená metodou FRAP vyšší než u metody ABTS. Pro metodu FRAP byly získány hodnoty $88,31 \pm 1,96$ mg TEAC/g vzorku.

V mém experimentu byla antioxidační aktivita methanolového extraktu stanovena metodou ABTS (9,15 mg TEAC/g) vyšší než metodou FRAP (4,12 mg TEAC/g). Podobné výsledky byly získány v práci (78) ze vzorku houby růžové hlívy ústříčné (*Pleurotus eous*). Antioxidační aktivita methanolového extraktu této houby, stanovená metodou ABTS, činila

17,0±0,39 (mg/mL). Metodou FRAP byla stanovena antioxidační aktivita methanolového extraktu, která činila 4,5±0,26 (mg/mL).

V mém experimentu byl metodou Folin-Cicolteu stanoven celkový obsah fenolických látek ve vzorku. Pro methanolovou extrakci houby *Cordyceps sinensis* byla získána hodnota 2,80 mg GAE/g. Podobné hodnoty methanolové extrakce, stanovené metodou Folin-Cicolteu, byly získány v práci (79) ze vzorku houby pečárky dvouvýtrusé (*Agaricus bisporus*). Průměrná hodnota, celkového obsahu fenolických látek, methanolové extrakce houby *Agaricus bisporus* činila ca 2,5 mg GAE/g.

6 ZÁVĚR

V experimentální části této práce bylo cílem stanovit vliv *in vitro* trávicího procesu na antioxidační vlastnosti houby *Cordyceps sinensis*. Po jednotlivých úpravách bylo získáno 10 vzorků, jejichž antioxidační aktivita byla stanovena metodami FRAP, ABTS a Folin-Ciocalteu. U metod FRAP a Folin-Ciocalteu vykazovaly nejvyšší antioxidační aktivitu vzorky po simulovaném *in vitro* trávení současně s roztoky bez enzymatických úprav. V případě metody ABTS vykazovaly nejvyšší antioxidační aktivitu vzorky methanolové extrakce a roztoky bez enzymatických úprav. Lze tedy konstatovat, že enzymatická úprava neměla pravděpodobně vliv na uvolnění látek s antioxidačním účinkem. K extrakci látek mohlo tedy dojít v důsledku pohybu zkumavky a změnou pH. Vliv na neúplnou extrakci látek mohl mít vzniklý sediment na dně zkumavky. Pro eliminaci tvorby tohoto sedimentu bych pro příští měření zvolila snížení navážky extraktu, protože ve většině případů musely být roztoky ředěny. Další možností, jak předejít vzniku sedimentu, je volba jiné techniky simulující peristaltiku střeva.

POUŽITÁ LITERATURA

1 DENG X.L., YANG K. a FARVE A., *Building an Integrative and Testable Hypothesis on How Edaphic Factors Ultimately Influence the Occurrence and Quality of Ophiocordyceps Sinensis, the Vegetable Caterpillar*, Research Square, 2021. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-257697/v1>

2 SHASHIDHAR, M.G., GIRIDHAR P. a SANKAR K.U., *Bioactive principles from Cordyceps sinensis: A potent food supplement – A review*, Journal of Functional Foods, 2013, ročník 5, číslo 3. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.04.018>

3 ELKHATEEB, W.A. a DABA G., *The endless nutritional and pharmaceutical benefits of the Himalayan gold, Cordyceps; Current knowledge and prospective potentials*, Biofarmasi Journal of Natural Product Biochemistry, 2020, ročník 18, číslo 2. DOI: [doi:10.13057/biofar/f180204](https://doi.org/10.13057/biofar/f180204)

4 KARMAŃSKA, A. a KARWOWSKI B. T., *Bioaktywne składniki Cordyceps sinensis*, FARMAKOGNOZJA, 2022, ročník 78, číslo 7. DOI: [10.32383/farmpol/153911](https://doi.org/10.32383/farmpol/153911)

5 CHEN, P. X., WANG S., NIE S. a MARCONE M., *Properties of Cordyceps Sinensis: A review*, Journal of Functional Foods, 2013, ročník 5, číslo 2. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.034>

6 JI, D.B., YE J., LI CH.L., WANG Y.H., ZHAO J. a CAI S.Q., *Antiaging effect of Cordyceps sinensis Extract*, Wiley Interscience, 2008, ročník 23, číslo 1. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.2576>

7 *CORDYCEPS (Housenice čínská) – léčivá houba*. Stránky čínské medicíny, 2022. Dostupné z: <https://www.strankycinskemediciny.cz/cordyceps>

8 QU S.L., LI S.S., ZHAO D.L. a ZHAO P.J., *Metabolites and Their Bioactivities from the Genus Cordyceps*, Microorganism, 2022, ročník 10, číslo 8. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081489>

9 ZHOU X. W., LI L.J. a TIAN E.W. *Advances in research of the artificial cultivation of Ophiocordyceps sinensis in China*, Critical Reviews in Biotechnology, 2013, ročník 34, číslo 3. DOI: [10.3109/07388551.2013.791245](https://doi.org/10.3109/07388551.2013.791245)

10 SHAO J.L., LAI B., JIANG W., WANG J.T., HONG Y.H., CHEN F.B., TAN S.Q. a GUO L.W., *Diversity and Co-Occurrence Patterns of Soil Bacterial and Fungal Communities of Chinese Cordyceps Habitats at Shergyla Mountain, Tibet: Implications for the Occurrence*, Microorganism, 2019, ročník 7, číslo 9. DOI: [10.3390/microorganisms709028](https://doi.org/10.3390/microorganisms709028)

11 *Cordyceps sinensis: A magical Himalayan Herb*. Dostupné z: <https://www.linkedin.com/pulse/cordyceps-sinensis-magical-himalayan-herb-vivek-singh>

12 LIU G., HAN R. a CAO L., *Artificial Cultivation of the Chinese Cordyceps From Injected Ghost Moth Larvae*, Environmental Entomology, 2019, ročník 48, číslo 5. DOI: [10.1093/ee/nvz099](https://doi.org/10.1093/ee/nvz099)

- 13 XU Y., LIA F., XU C., LUO S., CHAO S., GUO, Y., LIU CH. a ZHANG L., *Quantitative assessment of the ecological impact of Chinese cordyceps collection in the typical production areas*, *Écoscience*, 2016, ročník 22, číslo (2-4). DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/11956860.2016.1181516>
- 14 WINKLER D., *Caterpillar Fungus (Ophiocordyceps sinensis) Production and Sustainability on the Tibetan Plateau and in the Himalayas*, *Asian Medicine*, 2009, ročník 5, DOI: 10.1163/157342109X568829
- 15 OLATUNJI O.J., TANG J., TOLA A., AUBERON F., OLUWANIYI O., OUYANG Z., *The genus Cordyceps: An extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology*, *Fitoterapia*, 2018, ročník 129. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.05.010>
- 16 BUENZ E.J., BAUER B.A., OSMUNDSON T.W. a T.J. MOTLEY T.J., *The traditional Chinese medicine Cordyceps sinensis and its effects on apoptotic homeostasis*, Elsevier, 2004, ročník 96, číslo (1-2). DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.029>
- 17 ZHOU Y., WANG M., ZHANG H., HUANG Z. a MA J., *Comparative study of the composition of cultivated, naturally grown Cordyceps sinensis, and stiff worms across different sampling years*. *PLOS ONE*, 2019, ročník 4. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225750>
- 18 PANDEY K., *A review of the medicinal value of Ophiocordyceps sinensis (Yarshagumba)*, *Asian Society of Pharmacognosy*, 2022, ročník 6, číslo 1, ISSN -0128-1119. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Karuna-Pandey-3/publication/365047649_A_review_of_the_medicinal_value_of_Ophiocordyceps_sinensis_Yarshagumba/links/6363d942431b1f5300689d3e/A-review-of-the-medicinal-value-of-Ophiocordyceps-sinensis-Yarshagumba.pdf
- 19 KUNIYAL CH.P. a SUNDRIYAL R.C., *Conservation salvage of Cordyceps sinensis collection in the Himalayan mountains is neglected*. *Ecosystem Services*, 2013, ročník 5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoser.2012.12.004>
- 20 DEVKOTA, S., *Yarsagumba [Cordyceps sinensis (Berk.) Sacc.]; Traditional Utilization in Dolpa District, Western Nepal*, *Our Nature*, 2006, ročník 4, číslo 1. DOI: <https://doi.org/10.3126/on.v4i1.502>
- 21 KAYMACKI M.A. a GULER E.M., *Promising Potential Pharmaceuticals from the Genus Cordyceps for COVID-19 Treatment: A Review Study*, *Bezmialem Science*, 2020, ročník 8, číslo 3. DOI: 10.14235/bas.galenos.2020.4532
- 22 ELKHATEEB, W.A. a DABA G., *Cordyceps More Than Edible Mushroom-A Rich Source of Diverse Bioactive Metabolites with Huge Medicinal Benefits*, *Journal of Biomedical Research and Environmental Sciences*, 2022, ročník 3, číslo 5. DOI: 10.37871/jbres1481
- 23 CHEN Y.Y, CHEN CH.H., LIN W.CH., TUNG CH.W., CHEN Y.CH., YANG S.H., HUANG B.M., CHEN R.J., *The Role of Autophagy in Anti-Cancer and Health Promoting Effects of Cordycepin*. *Molecules* 2021, ročník 26. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26164954>

- 24 YAMAGUCHI Y., KATOOGA S., NAKAMURA K., SCHINOZUKA K. a KUNITOMO M., *Antioxidant Activity of the Extracts from Fruiting Bodies of Cultured Cordyceps sinensis*, *Phytotherapy research*, 2000, ročník 14. DOI: [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200012\)14:8<647::AID-PTR670>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200012)14:8<647::AID-PTR670>3.0.CO;2-W)
- 25 YUAN Q., XIE F., TAN J., YUAN Y., MEI H., ZHENG Y. a SHENG R., *Extraction, structure and pharmacological effects of the polysaccharides from Cordyceps sinensis: A review*, *Journal of Functional Foods*, 2022, ročník 89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104909>
- 26 JOSHI D.R. a ADHIKARI N., *Cordyceps sinensis and Influenceable Articles on it*, *Advanced Journal of Chemistry-Section B*, 2020, ročník 2, číslo 4. DOI: 10.33945/SAMI/AJCB.2020.4.7
- 27 YAO CH.L., QIAN M.Z., TIAN W.S., et al., *Profiling and identification of aqueous extract of Cordyceps sinensis by ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole-orbitrap mass spectrometry*, *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2019, ročník 17, číslo 8. DOI: 10.1016/S1875-5364(19)30066-4
- 28 LIU Y., WANG J., WANG W., ZHANG H., ZHANG X.Z. a HAN CH., *The Chemical Constituents and Pharmacological Actions of Cordyceps sinensis*, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/575063>
- 29 LIU W., GAO Y., ZHOU Y., YU F., LI X. a ZHANG N., *Mechanism of Cordyceps sinensis and its Extracts in the Treatment of Diabetic Kidney Disease: A Review*, *Frontiers in Pharmacology*, 2022, ročník 13. DOI:10.3389/fphar.2022.881835
- 30 LI S.P., YANG F.Q. a K.W.K. TSIM. *Quality control of Cordyceps sinensis, a valued traditional Chinese medicine*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, ročník 41, číslo 5. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.01.046
- 31 ZENG P., LI J., CHEN Y. a ZHANG L., *The structures and biological functions of polysaccharides from traditional Chinese herbs*, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2019, ročník 163. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.03.003>
- 32 WANG J., CHEN S., NIE S., CUI S.W., WANG Q., PHILLIPS A.O. a XIE M., *Structural Characterization and Chain Conformation of Water Soluble β -Glucan from Wild Cordyceps sinensis*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, ročník 67. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05340>
- 33 LI, S.P., ZHANG G.H., ZENG Q., HUANG Z.G., WANG Y.T., DONG T.T.X. a TSIM K.W.K. *Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured Cordyceps mycelia*, *Phytomedicine*, 2006, ročník 13. DOI: 10.1016/j.phymed.2005.02.002
- 34 WANG Y., YIN H., LV X., WANG Y., GAO H. a WANG M., *Protection of chronic renal failure by a polysaccharide from Cordyceps sinensis*. *Fitoterapia*, 2010, ročník 81, číslo 5. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.11.008

- 35 MAO, Y.H., SONG F.L., XU Y.X., et al. *Extraction, Characterization, and Platelet Inhibitory Effects of Two Polysaccharides from the Cs-4 Fungus*, International Journal of Molecular Sciences, 2022, ročník 23, číslo 20. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms232012608>
- 36 CHEN J., CHAN W.M., LEUNG H.Y., LEONG P.K., YAN CH.T.M. a KO K.M., *Anti-Inflammatory Effects of a Cordyceps sinensis Mycelium Culture Extract (Cs-4) on Rodent Models of Allergic Rhinitis and Asthma*, Molecules, 2020, ročník 25, číslo 18. DOI:10.3390/molecules25184051
- 37 XIA M.CH., CAI L., XU F., ZHAN Q., FENG J., GUO CH., LI Q. a LI Z., *Whole-body chemical imaging of Cordyceps sinensis by TOF-SIMS to visualize spatial differentiation of ergosterol and other active components*, Microchemical Journal, 2022, ročník 177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107303>
- 38 JIA J.M., TAO H.H. a FENG B.M., *Cordyceamides A and B from the Culture Liquid of Cordyceps sinensis (BERK.) SACC*, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2009, ročník 57, číslo 1. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.57.99>
- 39 JIA J.M., MA X.CH., WU CH.F., WU L.J. a HU. G.S., *Cordycedipeptide A, a New Cyclodipeptide from the Culture Liquid of Cordyceps sinensis (BERK.) SACC*, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2005, ročník 53, číslo 5. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.53.582>
- 40 YE M., HU Z., FAN Y., HE L., XIA F. a ZOU G., *Purification and Characterization of an Acid Deoxyribonuclease from the Cultured Mycelia of Cordyceps sinensis*, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2004, ročník 37, číslo 4. DOI: <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2004.37.4.466>
- 41 LI H.P., HU Z., YUAN J.L., et al, *A novel extracellular protease with fibrinolytic activity from the culture supernatant of Cordyceps sinensis: purification and characterization*, Phytotherapy Research, 2007, ročník 21, číslo 12. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.2246>
- 42 ŠULC M., LACHMAN J., HAMOUZ K., ORSÁK M., DVOŘÁK P., HORÁČKOVÁ V., *Selection and Evaluation of Methods for Determination of Antioxidant Activity of Purple – and Red-Fleshed Potato Varieties*, Chemické Listy, 2007, ročník 101, číslo 7. Dostupné z <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1776>
- 43 BEDLOVIČOVÁ Z., STRAPÁČ I., BALÁŽ M. a SALAYOVÁ A., *A Brief Overview on Antioxidant Activity Determination of Silver Nanoparticles*, Molecules, 2020, ročník 25, číslo 14. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25143191>
- 44 MUNTEANU I.G. a APETREI C., *Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review*, International Journal of Molecular Sciences, 2021, ročník 22, číslo 7. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- 45 MO Y.N., CHENG F., YANG Z., et al., *Antioxidant Activity and the Potential Mechanism of the Fruit From Ailanthus altissima Swingle*, Frontiers in Veterinary science, 2021, ročník 8. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.784898>

- 46 LÜ J.M., LIN P.H., YAO Q. a CHEN CH., *Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems*, Molecular Medicine, 2010, ročník 14, číslo 4. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x
- 47 PIZZINO G., IRRERA N., CUCINOTTA M., et al., *Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health*, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- 48 FLIEGER J., FLIEGER W., BAJ J. a MACIEJEWSKI R., *Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles*, Materials, 2021, ročník 14, číslo 15. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma14154135>
- 49 DONTHA S., A Review on Antioxidant Methods, Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 2016, ročník 9, číslo 2. DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9s2.13092>
- 50 MILARDOVIC S., IVEKOVIC D. a GRABARIC B.S., *A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical*, Bioelectrochemistry, 2006, ročník 68, číslo 2. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2005.06.005>
- 51 CHAVAN V., KAMBLE H.V., WAGHMARE S.A., *A Short Review on Gas Chromatography*, World Journal of Pharmaceutical Research, 2023, ročník 12, číslo 5. DOI:10.20959/wjpr20235-27548
- 52 KOLEKTIV AUTORŮ, *Instrumentální analýza*, Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury, n.p., 1986, ISBN: 14 111/1983-32
- 53 NOVOTNÁ R., ŠILHA T. a TRÁVNÍČEK Z., *Spektrální metody studia chemických látek*. Olomouc, 2011, Učební text k praktickému cvičení Metody studia anorganických látek, Univerzita Palackého v Olomouci. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/afc/Studijni_materialy/Spektralni_metody.pdf
- 54 *Elektromagnetické spektrum*, webové stránky cs.khanacademy.org. Dostupné z <https://cs.khanacademy.org/science/obecna-chemie/xfed2aace53b0e2de:atomy-a-jejich-vlastnosti/xfed2aace53b0e2de:fotoelektronova-spektroskopie/a/light-and-the-electromagnetic-spectrum>
- 55 PUNGOR E.A., *Practical Guide to Instrumental Analysis*. Florida: CRC Press, 1995. ISBN 0-8493-8681-0
- 56 HEJSKOVÁ V., *UV/VIS spektrofotometrie a možnosti jejího využití v rámci vzdělávání učitelů chemie*. Praha, 2016. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze.
- 57 MORALES D. G., VALENCIA A., NÚÑEZ A.D., ESTRADA M.F., SANTOS O.L. a BELTRÁN O.G., *Development of a Low-Cost UV-Vis Spectrophotometer and Its Application for the Detection of Mercuric Ions Assisted by Chemosensors*, Sensors, 2020, ročník 20, číslo 3. DOI: <https://doi.org/10.3390/s20030906>
- 58 VEJRAŽKA M., *Uspořádání spektrofotometru*, 2008. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometrie>

- 59 MARTINKOVÁ Z., *Stanovení antioxidační aktivity fenolických látek v pivu*. Pardubice, 2009. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Česlová Lenka.
- 60 AGBOR G.A., VINSON J.A. a DONNELLY P.E., *Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay*, International Journal of Food Science, 2014, ročník 3, číslo. Dostupné z: <https://www.airitilibrary.com/Publication/alDetailedMesh?docid=P20151016002-201408-201511190018-201511190018-147-156#Summary>
- 61 BOLIGON A.A., MACHADO M.M. a ATHAYDE M.L., *Technical Evaluation of Antioxidant Activity*, Medicinal Chemistry, 2014, ročník 4, číslo 7. DOI:10.4172/2161-0444.1000188
- 62 BRUNEAU E., *Basic Anatomy and Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Passing the Certified Bariatric Nurses Exam, 2017. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-41703-5_6
- 63 VAN DE GRAAFF K.M., *Anatomy and physiology of the gastrointestinal tract*, The Pediatric Infectious Disease Journal, 1986. DOI: 10.1097/00006454-198601001-00005
- 64 RUIZ M., *Schéma trávicí soustavy člověka*, 2006. Dostupné z: [Digestive system diagram cs – Trávicí soustava člověka – Wikipedie \(wikipedia.org\)](https://cs.wikipedia.org/wiki/Digestive_system_diagram)
- 65 LI CH., JU W.W., WU P. a CHEN X.D., *Current in vitro digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract*, Trends in Food Science & Technology, 2020, ročník 26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.015>
- 66 TARABA P., *Přístup zdravotnického záchranáře k akutnímu krvácení do GIT*. Kladno, 2021. Bakalářská práce. ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE. Vedoucí práce Jan Pokorný.
- 67 ČERVENÝ P., et al., *Polékové poškození jater*, Praktické lékařství, 2013, ročník 9, číslo 3. Dostupné z: <https://farmaciepropraxi.cz/pdfs/lek/2013/03/06.pdf>
- 68 FIALOVÁ L., *Slinné peptidy a proteiny, jejich struktura a význam v ústní dutině*, Chemické listy, 2019, ročník 113, číslo 10. Dostupné z: <http://www-chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3469/3416>
- 69 KREJČOVÁ V., *Ošetrovatelská péče o pacienta s Crohnovou chorobou*, Plzeň, 2020. Bakalářská práce. Západočeská Univerzita v Plzni.
- 70 LI I., XU R., XIU H., FENG J., PARK H.J., PRABHKAR H. a KONG F., *Effect of cinnamon on starch hydrolysis of rice pudding: Comparing static and dynamic in vitro digestion models*, Food Research International, 2022, ročník 161. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111813>
- 71 DUPONT D. a MACKIE A.R., *Static and dynamic in vitro digestion models to study protein stability in the gastrointestinal tract*, Drug Discovery Today: Disease Models, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2016.06.002>
- 72 BÍLKOVÁ Z. (autorka práce), *foto*

- 73 FRÜHBAUEROVÁ M., ČERVENKA L., HÁJEK T., POUZAR M. a PALARČÍK J., *Bioaccessibility of phenolics from carob (Ceratonia siliqua L.) pod powder prepared by cryogenic and vibratory grinding*, Food Chemistry, 2022, ročník 377. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131968>
- 74 ČERVENKA L., FRÜHBAUEROVÁ M., PALARČÍK J., MURIQI S. a VELICHOVÁ H., *The Effect of Vibratory Grinding Time on Moisture Sorption, Particle Size Distribution, and Phenolic Bioaccessibility of Carob Powder*, Molecules, 2022, ročník 27, číslo 22. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27227689>
- 75 ČERVENKA L., FRÜHBAUEROVÁ M. a VELICHOVÁ H., *Functional Properties of Muffin as Affected by Substituting Wheat Flour with Carob Powder*, Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences, 2019, ročník 13, číslo 1. DOI: <https://doi.org/10.5219/1033>
- 76 DONG C.H. a YAO Y.J., *In vitro evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts from natural and cultured mycelia of Cordyceps sinensis*, LWT – Food Science and Technology, 2008, ročník 41, číslo 4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.05.002>
- 77 SMOLSKAITE L., VENSKUTONIS P.R. a TALOU T., *Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species*, LWT – Food Science and Technology, 2015, ročník 60, číslo 1. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.007>
- 78 SUDHA G., VADIVUKKARASI S., SHREE R.B.I. a LAKSHMANAN P., *Antioxidant Activity of Various Extracts from an Edible Mushroom Pleurotus eous*, Food Science and Biotechnology, 2012, ročník 21, číslo 3. DOI: [10.1007/s10068-012-0086-1](https://doi.org/10.1007/s10068-012-0086-1)
- 79 KRÜZSLELYI D., MÓRICZ A.M. a VETTER J., *Comparison of different morphological mushroom parts based on the antioxidant activity*, LWT – Food Science and Technology, 2020, ročník 127. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109436>