

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor: Chemie (3)

Fytochemická analýza a antidiabetický potenciál
Arctium nemorosum

Phytochemical analysis and antidiabetic potential of
Arctium nemorosum

Autor: Jankovská Lenka

Škola: Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 55, 616 00 Brno-střed

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: PharmDr. Milan Malaník, Ph.D.

Rok: 2026

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Beru na vědomí, že nejpozději odevzdáním slovesné vědecké práce do veřejné soutěže Středoškolská odborná činnost, stejně jako odevzdáním jejích příloh a dalších připojených děl, např. audiovizuálních, fotografických, výtvarných, architektonických apod. (dále jen „soutěžní dílo“), dochází ke zveřejnění díla podle § 4 odst. 1 zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „autorský zákon“). Totéž platí pro pozdější odevzdání doplněného, změněného, upraveného nebo opraveného díla.

Beru na vědomí, že zveřejněním díla, jehož součástí je vynález, se tento vynález stává součástí stavu techniky podle § 5 odst. 1, 2 zákona č. 527/1990 Sb., o vynálezech, průmyslových vzorech a zlepšovacích návrzích, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „patentový zákon“), což zakládá překážku pro udělení patentu podle § 3 odst. 1 patentového zákona.

Beru na vědomí, že vyhlašovatel soutěže je podle § 61 odst. 1 autorského zákona per analogiam oprávněn užít soutěžní dílo pro účely zajištění průběhu soutěže, zejména k zajištění transparentnosti soutěže a veřejnosti obhajob soutěžních prací. V odůvodněném rozsahu je tedy vyhlašovatel po dobu účasti autora v soutěži oprávněn zejména:

zhotovovat rozmnoženiny díla, je-li to nezbytné k seznámení účastníků soutěže, porotců nebo veřejnosti se soutěžní prací;

zapůjčit originál nebo rozmnoženinu díla účastníkům soutěže, porotcům nebo veřejnosti. Přitom dbá na bezpečné nakládání s dílem;

vystavovat originál nebo rozmnoženinu díla v průběhu soutěžních přehlídek a doprovodných akcí;

sdělovat dílo veřejnosti v nehmotné podobě, a to především počítačovou nebo obdobnou sítí.

Dále prohlašuji, že při tvorbě této práce jsem použil/a nástroj generativního modelu AI [ChatGPT, DeepL] za účelem kontroly gramatiky a interpunkce, reformulace textu a překladu. Po použití tohoto nástroje jsem provedla kontrolu obsahu a přebírám za něj plnou zodpovědnost.

V Brně dne 30.1.2026 Lenka Jankovská

Poděkování

Mé poděkování patří především PharmDr. Milanu Malaníkovi, Ph.D., který svědomitě vykonával náročnou práci školitele. Děkuji mu za ochotu mi se vším pomoci a za trpělivost, kterou během práce projevoval. Děkuji také za cenné rady a trpělivé vysvětlení všech nejasností, které se během práce objevily.

Dále bych ráda poděkovala Farmaceutické fakultě Masarykovy univerzity v Brně za možnost realizace práce na Ústavu přírodních léčiv.

Nakonec děkuji své rodině, která mě podporovala, a přátelům, kteří mě vždy podrželi a dodali motivaci, kterou jsem potřebovala.

Anotace

Hlavní náplní práce bylo zaměření se na problematiku onemocnění diabetes mellitus, které představuje celosvětový zdravotní problém. Práce se dále zaměřovala na charakteristiku rodu *Arctium* a upozornění na jeho antidiabetické účinky, které lze využít při řešení problému s onemocněním diabetes mellitus. Součástí práce bylo také provedení fytochemické analýzy plodů druhu *A. nemorosum* a porovnání obsahových látek s dalšími druhy rodu *Arctium*. Analýza byla provedena chromatografickou metodou HPLC-DAD/ELSD a metodou TLC. Cílem bylo zjistit, zda jednotlivé druhy obsahují stejné dominantní látky a mohlo by tak v budoucnu docházet k záměně využívaných druhů. Analýza látek zkoumaného druhu *A. nemorosum* potvrdila výskyt lignanů, které se nachází taktéž v druhu *A. lappa*, který je používán v terapeutických léčivech a doplňcích stravy.

Klíčová slova

antidiabetické účinky; *Arctium*; diabetes mellitus; HPLC; lignany

Annotation

The main focus of the work was on diabetes mellitus, which is a global health problem. The work also focused on the characteristics of the *Arctium* genus and highlighted its antidiabetic effects, which can be used to treat diabetes mellitus. The work also included a phytochemical analysis of the fruits of *A. nemorosum* and a comparison of their content with other species of the genus *Arctium*. The analysis was performed using the HPLC-DAD/ELSD chromatographic method and the TLC method. The aim was to determine whether the individual species contain the same dominant substances and whether the species used could be confused in the future. Analysis of the substances in the studied species *A. nemorosum* confirmed the presence of lignans, which are also found in the species *A. lappa*, which is used in therapeutic medicines and dietary supplements.

Keywords

antidiabetic effects; *Arctium*; diabetes mellitus; HPLC; lignans

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Rod <i>Arctium</i>	9
2.1.1	Taxonomická klasifikace rodu <i>Arctium</i>	9
2.1.2	Botanická charakteristika rodu <i>Arctium</i>	10
2.1.3	Rozšíření rodu <i>Arctium</i>	11
2.2	Druh <i>Arctium nemorosum</i>	11
2.2.1	Botanická charakteristika <i>Arctium nemorosum</i>	11
2.3	Diabetes mellitus.....	12
2.3.1	Civilizační onemocnění	12
2.3.2	Charakteristika diabetu mellitus	13
2.3.3	Klasifikace diabetu mellitus	13
2.3.4	Antidiabetické účinky rodu <i>Arctium</i>	16
2.3.5	Potenciál rodu <i>Arctium</i>	16
3	Cíl práce	17
4	Experimentální část	18
4.1	Použitý materiál a přístroje	18
4.1.1	Rostlinný materiál	18
4.1.2	Chemikálie	18
4.1.3	Laboratorní přístroje, pomůcky a zařízení	19
4.1.4	Zařízení, přístroje a pomůcky pro TLC, HPLC-DAD/ELSD	19
5	Výsledky	20
5.1	Macerace	20
5.2	Analýza celkového extraktu pomocí HPLC	20
5.2.1	HPLC-DAD	20
5.2.2	HPLC-ELSD	21
5.2.3	TLC	22
5.3	Liquid-liquid extrakce.....	22
5.4	Analýza metanolového podílů	23
5.4.1	TLC	23
5.4.2	HPLC-DAD	24
5.4.3	Vyhodnocení elektronového spektra	25

5.4.4	Identifikace látek porovnáním se standardy	26
5.5	Analýza hexanového podílu.....	27
5.5.1	TLC	27
5.5.2	HPLC-ELSD	27
5.5.3	Identifikace látek porovnáním se standardy	28
5.6	Kvantifikace látek	29
5.6.1	Arctiin	29
5.6.2	Arctigenin	30
6	Diskuze	31
7	Závěr	34
8	Použitá literatura	35
9	Seznam použitých zkratk	37

1 ÚVOD

Léčivé rostliny představují dlouhodobě významný zdroj biologicky aktivních látek, které jsou využívány jak v moderní, tak v tradiční medicíně po celém světě. Hlavním důvodem využívání rostlin jako léčiv je jejich obsah účinných látek, které lze využít k objevování nových léků a následnému léčení nemocí. Možností, jak využít rostliny při výrobě nových léčiv, je více. Aktivní složky můžeme oddělovat pro přímé použití v léčivech nebo můžeme chemicky upravovat strukturu bioaktivní sloučeniny a následně vyvinout patentované léky s vyšší aktivitou nebo nižší toxicitou.[1] Můžeme ale také oddělené látky využít jako farmakologické prostředky. Jednotlivé části nebo celé rostliny mohou sloužit například jako bylinné léky. Tradiční medicína využívá informace získané z rostlin k objevování nových bioaktivních sloučenin, jež lze využít v moderní farmacii.[1] V posledních letech se výzkum nových léčiv stále více zaměřuje na využití přírodních látek při prevenci i léčbě civilizačních onemocnění.

Civilizační nemoci představují jeden z největších zdravotních problémů lidstva. Jedná se o nemoci, které souvisí se způsobem života člověka. Vznikají v důsledku nesprávných každodenních návyků. Podle odhadů Světové zdravotnické organizace (WHO) každoročně na civilizační nemoci umírá přibližně 41 milionů lidí.[2] Mezi nejčastější příčiny smrti patří kardiovaskulární choroby, nádorové onemocnění, respirační choroby a diabetes mellitus 2. typu.[2]

Diabetes mellitus je metabolické onemocnění charakterizované nedostatečnou produkcí inzulínu nebo jeho neefektivním využitím.[3] Rozlišujeme tři typy onemocnění diabetes mellitus: Diabetes mellitus 1. typu je autoimunitní onemocnění. Diabetes mellitus 2. typu je civilizační nemoc, způsobená špatným životním stylem, jedná se o nejčastější typ diabetu. 3. typem je gestační diabetes mellitus, který se objevuje během těhotenství, kdy hormony produkované placentou způsobují rezistenci inzulínu v těle ženy.[3] S rostoucím výskytem diabetes mellitus se zvyšuje potřeba najít účinný a bezpečný způsob léčení této nemoci. Přírodní látky obsažené v rostlinách mohou představovat kvalitní a cenný zdroj antidiabetických účinků, které napomáhají v léčbě diabetes mellitus. Tyto účinné látky můžeme najít například v rostlinách rodu *Arctium*, který je dlouhodobě využíván pro bioaktivní látky.

Druhy rodu *Arctium* (lopuch) jsou tradiční léčivé rostliny v evropské i čínské medicíně. Díky obsahu různorodých sekundárních metabolitů jsou využívány ve farmakologii. Rod *Arctium* je významný pro své bioaktivní vlastnosti, mezi které řadíme i antidiabetické účinky.[4] Mezi

běžně rostoucí druhy rodu *Arctium* v Evropě patří *A. lappa* (Hill) Bernh., *A. minus* (Hill) Bernh., *A. tomentosum* Mill. a *A. nemorosum* Lej. Nejrozšířenějším druhem je *A. lappa*, který je běžným léčivem čínské medicíny, a to díky vysokému množství bioaktivních metabolitů.[4, 5]

Pozornost je hlavně věnována druhu *Arctium nemorosum* (lopuch hajní), který se běžně vyskytuje v evropské flóře, ale dosud u něho chybí podrobnější vědecké zpracování, což omezuje možnosti dalších navazujících výzkumů a tím hlubšího poznání jeho biologických účinků. Nedostatek dostupných informací z tohoto druhu činí zajímavý objekt pro náš výzkum.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Rod *Arctium*

Druhy rodu *Arctium*, běžně označované jako lopuchy, jsou tradiční rostliny využívané v medicíně. Název tohoto rodu vychází z řeckého slova „αρχτειον“ (arcteion), které v překladu znamená „medvěd“, což pravděpodobně odkazuje na vzhled rostliny charakterizovaný mohutným vzrůstem a pokrytím drobnými chloupky. Charakteristickým symbolem lopuchu je také jeho květenství, které se díky ostnům, kterými je zcela pokryto, lehce přichytí na oděv nebo do vlasů. Podle této vlastnosti pro tento rod existuje spousta českých lidových označení, které se v běžném jazyce objevují, ale botanicky nejsou správná. Místo pravého jména rostliny můžeme podle regionu slyšet slangové pojmenování, v Čechách to může být označení „žebrák“ a na Moravě hlavně označení „vlk“. Častým označením je i slovo bodlák či kudlibabka.[4, 6]

2.1.1 Taxonomická klasifikace rodu *Arctium*

Uznávaných druhů rodu *Arctium* je podle databáze The Plant List osmnáct, z nichž pět je považovaných za hybridní druhy neboli druhy vzniknuté křížením. Křížení druhů nastává hlavně v důsledku introgrese neboli cizopasného křížení, kdy dojde k narušení reprodukční bariéry mezi jednotlivými druhy a geny rostlin se začnou promíchávat. V České republice se běžně vyskytují čtyři druhy rodu *Arctium* a to nejčastější *A. lappa* (lopuch větší), dále *A. minus* (lopuch menší), *A. tomentosum* (lopuch plstnatý) a *A. nemorosum* (lopuch hajní).[4]

Taxonomicky je rod *Arctium* klasifikován do čeledi Asteraceae, česky hvězdnicovitě. Čeleď Asteraceae patří k jedné z nejrozšířenějších čeledí kvetoucích rostlin. Zástupci této čeledi jsou dlouhodobě využívány jako potraviny nebo v léčitelství, a to nejen lidovém, ale i oficiálním.

I přes velké zastoupení této čeledi má většina rostlin podobné chemické složení a vlastnosti. Nejdůležitější schopností, které rostliny z této čeledi vykazují jsou protizánětlivé a antioxidační účinky. Čeleď Asteraceae je tradičně pro lidské zdraví považována za prospěšnou.[7]

Tab. 1: Taxonomická klasifikace rodu *Arctium*

<i>Regnum</i> (říše)	<i>Plantae</i> (rostliny)
<i>Divisio</i> (oddělení)	<i>Magnoliophyta</i> (krytosemenné)
<i>Classis</i> (třída)	<i>Magnoliopsida</i> (dvouděložné)
<i>Ordo</i> (řád)	<i>Asterales</i> (hvězdnicotvaré)
<i>Familia</i> (čeleď)	<i>Asteraceae</i> (hvězdnicovité)
<i>Genus</i> (rod)	<i>Arctium</i> L. (lopuch)

2.1.2 Botanická charakteristika rodu *Arctium*

Vzhled rodu *Arctium* je charakterizován několika prvky. Rostliny tohoto rodu jsou statné, některé druhy se mohou dorůstat až 2,5 metru.[8] Jedná se převážně o dvouleté byliny, které jsou hemikryptofyty, tedy uchovávají své přezimující pupeny na povrchu půdy nebo těsně pod ní, a jejich nadzemní část na zimu odumírá.[4]

Lodyha těchto druhů je silná, vzpřímená, větvená, rýhovaná a také bývá lehce načervenalá. Kořen nacházející se pod půdou je drsný, mohutný, větvenovitý a vnitřek kořene, na rozdíl od šedohnědého zbytku, bývá zbarvený do bílé barvy. Z lodyhy vyrůstají listy, které mění svůj tvar a stavbu listových řapíků podle jednotlivých druhů.[6] Listy mohou být srdčité či vejčité a mohou být doprovázeny zákrovními listy. Řapíky jsou buď duté, nebo plné.

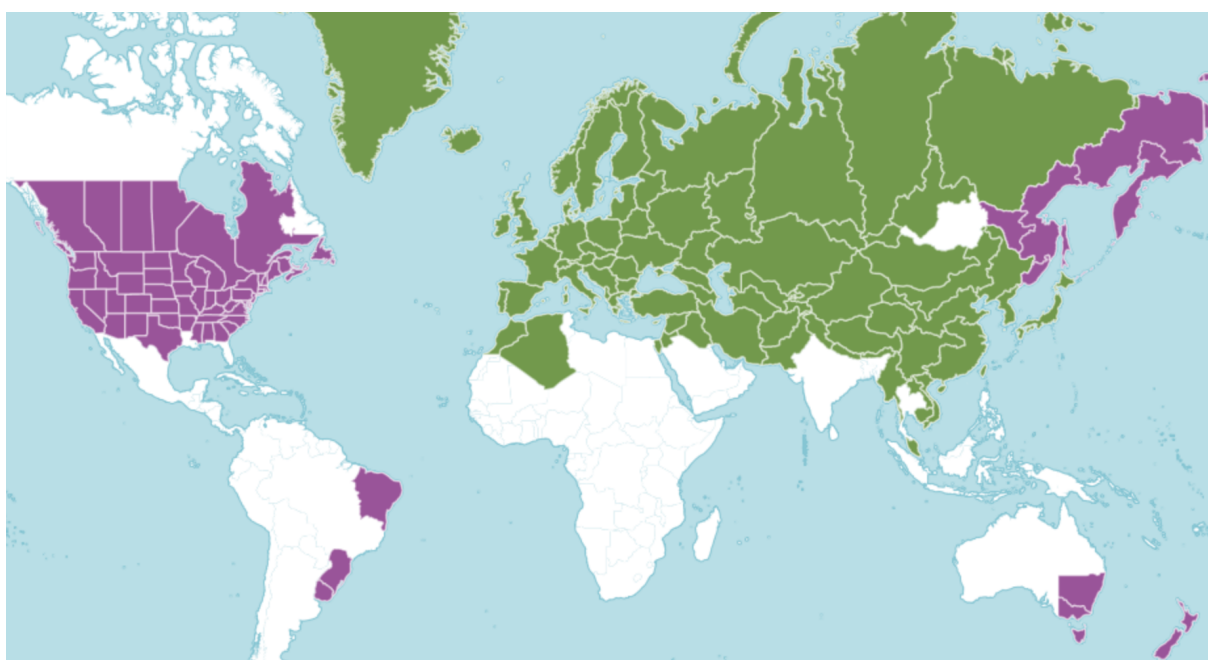
Květenství tvoří jednotlivé nebo chocholičnatě sdružené úbory. Květové lůžko, v němž je uložen květ, je tvořeno četným počtem tvrdých šupin. Oboupohlavní květy jsou zbarvené jemnou fialovou a bílou barvou. Plodem jsou podlouhlé nažky, které mají zlatožlutou barvu. [4]

Jednotlivé druhy rodu *Arctium* lze rozlišit dle jejich stavby listových řapíků, typu květenství či přítomnosti pavučinovitého ochlupení na háčkovitých zákrovních listenech. Vzhledem k různorodosti a variabilitě vzhledu není vždy možné druh jednoznačně určit.[8] Pro naši práci je ale důležitý druh *A. nemorosum*, u kterého přesnou botanickou charakteristiku popíšeme později.

2.1.3 Rozšíření rodu *Arctium*

Druhy rodu *Arctium* jsou rozšířené po celém světě. Jejich přirozené prostředí se ale nachází především v lesích a lesnatých oblastech mírného pásu Evropy a Asie.[4]

Na obrázku 1 zelená barva znázorňuje původ a přirozený výskyt bylin z rodu *Arctium*. Rostliny se tedy přirozeně vyskytují v Evropě, střední i západní Asii a také na severu Afriky. Fialová barva naopak znázorňuje výskyt tohoto rodu po světě jako introdukovaného. Tyto rostliny tedy můžeme najít už i v Severní a Jižní Americe, na východě Asie, ale také na Novém Zélandě a v části Austrálie.



Obrázek 1. Světové rozšíření rodu *Arctium* (zelená = přirozený, fialová = introdukovaný), zdroj: Databáze POWO 2023

2.2 Druh *Arctium nemorosum*

Jedním z druhů rodu *Arctium* je *Arctium nemorosum*, česky lopuch hajní, o kterém nebyly doposud provedeny podrobné studie, a jeho účinné látky nebyly dostatečně prozkoumány. Díky studiím o obsahových látkách jiných druhů rodu *Arctium*, můžeme předpokládat podobné složení.

2.2.1 Botanická charakteristika *Arctium nemorosum*

Jednotlivé druhy rodu *Arctium* se stejně jako ostatní rostliny přirozeně liší. Skutečnost, že některé rostliny jsou si podobnější než jiné, je přirozená variabilita organismů. Tyto rozdíly se

projevují nejen v obsahových látkách, ale i vnějším vzhledem, tedy botanickou charakteristikou.

Arctium nemorosum je vytrvalá bylina z čeledi hvězdnicovitých, která se přirozeně nachází na lesních stanovištích, a to především v listnatých lesích. Rostlina kvete od července do září a dorůstá se výšky 0,9–2,2 metrů. Větve tohoto lopuchu jsou ze začátku na lodyze vzpřímené, ale během kvetení a v době tvorby plodů se jeho větve typicky obloukovitě svěsí směrem dolů. Řapíky listů jsou duté a jeho úbory, podobně jako u druhu *A. minus*, se sdružují do hroznovitého květenství.[8]

Úbory umístěné na větvích chrání květy pomocí zákrovu. Zákrov, obal květenství, sloužící k obraně jednotlivých květů, je většinou řídce pokryt pavučinatým ochlupením.[4, 6]

Samostatné květy jsou pak fialově zbarvené. Vnitřní zákrovní listeny bývají stejně dlouhé jako samotné květy lopuchu hajního. Nažka je suchý jednosemenný plod s velikostí 8–11 mm, má válcovitý tvar, který je na vrcholu zakončen háčkem. Tento háček napomáhá šíření semene.[6]

Botanická charakteristika je pro nás důležitým faktorem k rozeznání jednotlivých druhů rostlin, podle ní pak můžeme následně s rostlinou pracovat a využívat její účinné látky. Velká většina rostlin, podobně jako je to u některých druhů rodu *Arctium*, pro nás má nejen ekologický význam, ale jsou také výrazně využívány v tradiční či moderní medicíně. Tento fakt nás přivádí k problematice lidských onemocnění. Stále častějším, a tedy i nebezpečným onemocněním se stává diabetes mellitus.

2.3 Diabetes mellitus

2.3.1 Civilizační onemocnění

Diabetes mellitus, česky cukrovka, patří mezi civilizační nemoci. Jde o skupinu onemocnění, které představují celosvětový problém. Jedná se o nemoci, které jsou především způsobeny špatnými každodenními návyky a nezdravým životním stylem. Mezi hlavní negativní návyky, které si dnešní společnost, kvůli její zvýšené frekventovanosti normalizovala, patří kouření, konzumace alkoholu, nezdravá strava a nedostatek pohybu.[2]

Dříve byly hlavní příčinou úmrtí nakažlivé nemoci. V dnešní době tyto nemoci sice stále představují vážné zdravotní problémy, ale mezi hlavní příčiny úmrtí se staly právě nenakažlivé

neboli chronické nemoci. Tyto onemocnění se většinou projeví u jedince později během jeho života a mají dlouhé trvání.[2]

Světová zdravotnická organizace (WHO) odhadla, že v roce 2018 bylo 71 % všech úmrtí způsobeno právě chronickými onemocněními, což odpovídá 41 milionům lidí.[2] Mezi chronické nemoci, které představují pro lidstvo velké riziko, patří kardiovaskulární onemocnění, jež jsou nejčastější příčinou úmrtí a každý rok umírá na tyto onemocnění necelých 18 milionů lidí. Mezi kardiovaskulární nemoci patří například infarkt myokardu nebo cévní mozková příhoda.[2]

Mezi další civilizační onemocnění se řadí rakovina, chronická respirační onemocnění nebo právě diabetes mellitus.[2]

2.3.2 Charakteristika diabetu mellitus

Diabetes mellitus je nejčastější metabolické onemocnění, které se v posledních letech vyskytuje čím dál víc. Toto chronické onemocnění je způsobeno nedostatečnou produkcí inzulínu v těle nebo neschopností účinně využít vytvořený inzulín.[3]

Inzulín je peptidový hormon vytvářený buňkami slinivky břišní. Pro člověka je důležitý zejména díky jeho schopnosti regulovat množství glukózy v krvi. Dokáže regulovat metabolismus živin, například sacharidů nebo bílkovin, a pomáhá k buněčnému získávání energie z glukózy.[9]

Diabetes doprovází několik příznaků, které lze rozeznat i bez laboratorního vyšetření. Častým příznakem je zvýšená žízeň, časté močení, slabost a únava. Bezpečně ale lze onemocnění odhalit dvěma laboratorně detekovatelnými příznaky a to výskytem hyperglykémie neboli vysoké hladiny cukru (glukózy) v krvi a glykosurie přítomností glukózy v moči.[6]

2.3.3 Klasifikace diabetu mellitus

Klasifikování typu diabetu často závisí na klinickém obrazu pacienta při stanovení diagnózy, jinými slovy jde o soubor příznaků, nálezů a okolností, které lékař u pacienta zaznamená během zjištění výskytu onemocnění diabetes. V praxi lékaře hlavně zajímají tyto kritéria: stáří pacienta, obezita, přítomnost ketózy u pacienta, rychlost nástupu hyperglykémie. Rozeznat a diagnostikovat jednotlivé typy tohoto onemocnění je velmi důležité, špatná

diagnóza může pro pacienta znamenat doživotní následky nebo mu může hrozit i smrt. Tyhle scénáře se hlavně týkají nerozeznání 1. typu diabetes mellitus.[10]

Jedním z nebezpečných následků záměny typů diabetes je diabetická ketoacidóza, která akutně ohrožuje stav pacienta. Ketoacidóza vzniká při přítomnosti ketolátek neboli kyselých látek v krvi, které okyselí krev a činí ji pro pacienta velmi nebezpečná. Tento stav se může projevovat i neurologickými příznaky. Typickými projevy diabetické ketoacidózy je časté močení, neustálá žízeň, únava, zmatenost nebo Kussmaulovo dýchání.[10]

Dalším nebezpečím, které pacientům může hrozit je hyperosmolární hyperglykemický stav, který se nachází především u starších pacientů 2. typu diabetu. Tento stav je charakterizovaný extrémní hyperglykemií, vysokou osmolaritou plazmy bez přítomnosti ketoacidózy. Neurologické projevy jsou častější a silnější. Dochází k poruchám vědomí i řeči, onemocnění může být doprovázeno epileptickými záchvaty či ochrnutím jedné poloviny těla.[10]

Tyhle důvody nám demonstrují, proč je důležité odlišovat jednotlivé typy diabetes mellitus. Rozeznáváme tři základní typy tohoto onemocnění, a to diabetes mellitus 1. typu, diabetes mellitus 2. typu a gestační diabetes mellitus.

Diabetes mellitus 1. typu

Diabetes mellitus 1. typu je autoimunitní onemocnění, při kterém tělo nedokáže produkovat inzulin. Charakteristickým znakem je destrukce β -buněk pankreatu. Tento typ onemocnění je méně častý, představuje kolem 10 % všech případů diabetu na světě.[11] Objeví se většinou v rané fázi života, tedy u malých dětí nebo mladých dospělých. Nelze však vyloučit výskyt tohoto typu během života nebo u starších lidí.[11]

Lidé s 1. typem diabetes mellitus potřebují k regulaci hladiny cukru každodenní příjem inzulinu, bez něho není buňka schopna absorbovat glukózu z krve a využít ji jako zdroj energie. Pacienti dostávají inzulin do těla nejčastěji injekčně nebo pomocí inzulinové pumpy.[3]

Diabetes mellitus 2. typu

Diabetes mellitus 2. typu, dříve označován jako neinzulin-dependentní diabetes mellitus, je nejčastější formou diabetu. Tvoří více než 90 % všech případů a některé země v důsledku rychlosti nárůstu mluví o začínající epidemii diabetu.[10]

Charakteristickými znaky diabetu 2. typu jsou výskyt hyperglykémie, deficit tvorby inzulínu nebo rezistence inzulínu v těle. Tato forma diabetu se může objevit kdykoli během života. Obvykle je ale diabetes diagnostikován u dospělých a seniorů. Přesné příčiny vzniku nejsou dosud objasněny, ale existuje několik rizikových faktorů, které výskyt onemocnění může podpořit.

Jedním z faktorů je obezita, nedostatek pohybu, špatná strava, vyšší věk, rodinná anamnéza diabetu, špatný životní styl.[3] Pro toto onemocnění dosud nebyla nalezena definitivní léčba, která by dokázala pacienty dokonale vyléčit. Existují ale terapeutické postupy, které zahrnují léčení obezity, úpravu životního stylu, inzulínové syntetizéry a perorální antidiabetika.

Samotné diagnostice diabetu 2. stupně předchází stav zvaný prediabetes. Jedná se o období, kdy hodnoty hladiny cukru v krvi jsou vyšší než normální hodnoty, ale nedosahují diagnostických kritérií diabetu. Prediabetes je vratný stav a časnou změnou životního stylu můžeme rozvoji diabetu 2. typu zabránit.[12]

Gestační diabetes mellitus

Gestační diabetes mellitus je typ diabetu objevujícího se u žen během těhotenství. Výskyt tohoto onemocnění může souviset s dříve nediagnostikovatelným diabetem 1. nebo 2. typu.[10] Onemocnění se ale může projevit i u žen, které se s žádným typem diabetu nesetkaly. Riziko výskytu gestačního diabetu hrozí u žen s vyšším věkem při otěhotnění, obezitou, prodělaným gestačním diabetem v minulosti nebo rodinnou anamnézou diabetu.[13, 14]

Příčinou onemocnění je vznik hyperglykémie během těhotenství. Zvýšená rezistence inzulínu je zaviněná hormony placenty. Gestační diabetes se obvykle objevuje na konci druhého trimestru těhotenství, nejčastěji během 24. týdne. Za normálních podmínek je v této době už plod dobře vyvinut a neohroží mu závažné riziko. Veškerá rizika však nelze vyloučit a onemocnění může mít závažné důsledky jak pro matku, tak pro dítě. Nekontrolovatelná glykémie může ovlivnit růst plodu a způsobit komplikace při přirozeném porodu dítěte.[13]

Gestační diabetes většinou po porodu vymizí, jedná se tak o dočasné onemocnění, ale návrat diabetu může hrozit během dalšího těhotenství nebo ve starším věku. Gestační typ diabetes mellitus není v dnešní době nic vzácného a řadí se mezi nejběžnější problémy během těhotenství.[3, 13]

2.3.4 Antidiabetické účinky rodu *Arctium*

Moderní ani tradiční medicína dosud nenalezla definitivní léčbu onemocnění diabetu; proto léčba diabetu, hlavně 2. typu, je spíše o změně životního stylu. Existuje však mnoho druhů syntetických léčiv pro diabetes, avšak jejich užívání je často doprovázeno mnoha nežádoucími účinky. Proto k léčbě tohoto onemocnění jsou často pacienti vyhledávána přírodní léčiva a doplňky stravy s antidiabetickým účinkem. Antidiabetické účinky byly vědecky prokázány u některých druhů rostlin z čeledi Asteraceae (hvězdnicovitých). Studie potvrdily například výskyt těchto účinků v rodu *Arctium*. Tyto rostliny by mohly v budoucnu napomoci k vývoji účinnějších a bezpečnějších léčiv diabetu.[15] Častým druhem, který se ve výrobě léčiva využívá, je *Arctium lappa*. Není to však jediný využívaný druh a do budoucna lze očekávat zaměňování jednotlivých druhů z rodu mezi sebou.

2.3.5 Potenciál rodu *Arctium*

Rod *Arctium* má v tradiční i čínské medicíně dlouhodobou tradici, je především využíván jako přírodní léčivo a doplněk stravy. Potenciál tohoto rodu je ale mnohem větší.

Rozšířeným druhem ve farmakologii je druh *Arctium lappa*. Důvod jeho využívání je obsah účinných látek, které lze naléznout v kořeni, listech i plodech rostliny. Četnost jeho účinných látek je zdrojem pro výrobu nových terapeutických léčiv a vylepšování současných doplňků stravy. Mezi důležité bioaktivní složky, které lze v rostlině najít, jsou lignany arctigenin a arctiin, dietní vláknina inulin, steroly a další obsahové látky.[16]

Antidiabetický potenciál ale není jediný pozitivní význam, který u tohoto rodu můžeme najít. Užitečných látek je v rostlinách rodu *Arctium* mnohem více. Z kořenů těchto rostlin lze získat fruktooligosacharidy, které vykazují široké spektrum farmakologických účinků. K těm kromě antidiabetických účinků patří i protizánětlivá, hypolipidemická a antivirová aktivita. Další účinnou látkou je kyselina chlorogenová, která své využití má v tradiční medicíně jako schopný antioxidant. Nízká toxicita a kvalita obsahových látek vzbudila pozornost mnoha odborníků. Stále častěji je debatováno a navrhováno plně využívat druhy *Arctium* při léčbě onemocnění, stále je ale jeho působení omezené, a to také v léčbě diabetu.[15]

Další využití látek z rodu *Arctium* můžeme naléznout v kosmetice. Krémy s obsahovými látkami tohoto rodu jsou tradičně používány k léčbě akné, suché pleti, ekzémů a různých kožních

problémů.[17] Látky získané z plodu druhu *A. lappa* dokážou zesvětlovat pokožku a zbavit jí tmavších skvrn, které narušují sjednocení pleti.[16]

Přítomnost látek z *Arctium* nalezneme i v mnoha homeopatických léčivech, kde jsou ceněny především díky pozitivnímu vlivu na kožní či lymfatické problémy.[18]

Rostliny tohoto rodu vykazují velký potenciál pro využití v mnoha oblastech medicíny. Mimo již zmiňované antidiabetické, dermatologické a protizánětlivé účinky rod vykazuje také protialergickou, protinádorovou, antibakteriální, antivirovou nebo hepatoprotektivní biologickou aktivitu.[18]

Rod *Arctium* je tedy opravdovým pokladem, co se jeho složení týče. Jeho kořeny a plody vykazují nespočetně mnoho biologicky aktivních látek s širokým spektrem účinků. Díky přírodnímu složení a jednotlivým vlivům látek se jedná o rostliny s velkým potenciálem ke tvorbě nových a bezpečných léčiv. Ze všech druhů je v lékařství nejčastěji využíván druh *Arctium lappa*, který ale může do budoucna představovat omezený zdroj potřebných účinných látek. Pokud však pomocí chemických analýz dosáhneme možnosti zaměřovat jednotlivé druhy mezi sebou a rozšířit tak využití i ostatních druhů, mohl by vzniknout širší a dostupnější zdroj účinných látek.

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo provést fytochemickou analýzu obsahových látek plodu *Arctium nemorosum* a vyzdvihnout potenciál druhů rodu *Arctium* v oblasti onemocnění diabetes mellitus. Dílčím cílem práce bylo provést fytochemickou analýzu látek v druhu *A. nemorosum*, který je dosud neprozkoumaným druhem, a následně identifikovat a kvantifikovat vybrané sekundární metabolity. Charakteristika a potenciál rodu *Arctium* společně s problematikou onemocnění diabetes mellitus byly shrnuty v teoretické části z dostupných odborných literárních zdrojů. Chemická analýza látek z plodů dosud pořádně neprozkoumaného druhu, *A. nemorosum*, měla za cíl zhodnotit využitelnost druhu jako alternativní zdroj pro budoucí potřebu bioaktivních látek druhů *Arctium* v medicíně. Jako alternativní zdroj látek může být druh využit pouze za předpokladu, že jednotlivé druhy obsahují podobné složení účinných látek.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý materiál a přístroje

4.1.1 Rostlinný materiál

Na experimentální část výzkumu byl použit rostlinný materiál, který pocházel z druhu *Arctium nemorosum* Lej. Rostlinný materiál nasbíral a identifikoval PharmDr. Milan Malaník, Ph.D., poblíž cyklostezky v katastru obce Popůvky, Brno-venkov (16°28'31.932"E, 49°11'47.681"N).

V experimentu bylo pracováno s 8,218 g plodů *A. nemorosum*.

4.1.2 Chemikálie

Rozpouštědla, která byla použita pro maceraci, liquid-liquid extrakci, TLC:

- denaturovaný etanol (Lihovar Kojetín)
- metanol p.a. (Lach-ner)
- *n*-hexan p.a. (Penta)
- chloroform p.a. (Lach-ner)
- tetrahydrofuran p.a. (Sigma-Aldrich)
- diethyléter (Lach-ner)
- destilovaná voda

Rozpouštědla, která byla použita pro HPLC:

- vysoce čištěná voda pro HPLC (připravená v systému na úpravu vody)
- kyselina mravenčí 98 % p.a. (Sigma-Aldrich)
- metanol pro HPLC (Sigma-Aldrich)
- acetonitril pro HPLC (Sigma-Aldrich)

Použité standardy látek:

Zdroj látek: látky byly v minulosti izolovány na ÚPL-Ústavu přírodních látek Farmaceutické fakulty Masarykovy univerzity, detailní postup izolace a identifikace látek je popsán v diplomové práci Veroniky Hamarové. [6]

- Matairesinol

- Diarcitigenin
- Arctigenin
- Lappaol A
- Lappaol C
- Isolappaol C
- Isolappaol A
- Arctiin

4.1.3 Laboratorní přístroje, pomůcky a zařízení

- analytické váhy Pioneer (Ohaus, USA)
- ultrazvuková vodní koupel Bandelin Sonorex Digitec (Bandelin, Germany)
- rotační vakuová odparka BÜCHI Rotavapor R-114, Waterbath B 480 (Büchi, Switzerland)
- lyofilizátor CHRIST ALPHA 1-2 LD (Christ, Germany)
- UV lampa se stativem ($\lambda = 253$ a 366 nm)
- laboratorní sklo a ostatní pomůcky

4.1.4 Zařízení, přístroje a pomůcky pro TLC, HPLC-DAD/ELSD

TLC

- hliníková fólie TLC Silikagel 60 F₂₅₄, rozměr 20 × 20 cm, tloušťka vrstvy 0,2 mm

HPLC

- vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent 1100 s Diode Array detektorem (DAD) (Agilent Technologies, USA)
- vysokoúčinný kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000 s UV a ELSD (Thermo Scientific, USA)
- analytická kolona Ascentis® Express RP-Amide, 10 cm x 2,1 mm, velikost částic 2,7 μ m (Supelco, USA)
- analytická kolona Ascentis® C18, 10 cm x 2,1 mm, velikost částic 2,7 μ m (Supelco, USA)

5 VÝSLEDKY

5.1 Macerace

Rostlinný materiál tvořily plody druhu *A. nemorosum*, které jsme následně v třence s těrkou rozetřeli tak, aby se lépe extrahovaly a účinné látky se z plodů uvolnily. Rostlinný materiál jsme následně extrahovali etanolem v poměru 1 : 20 (m/V). Rostlinný materiál jsme nechali extrahovat v Erlenmeyerově baňce v temné místnosti s konstantní laboratorní teplotou po dobu 72 hodin.

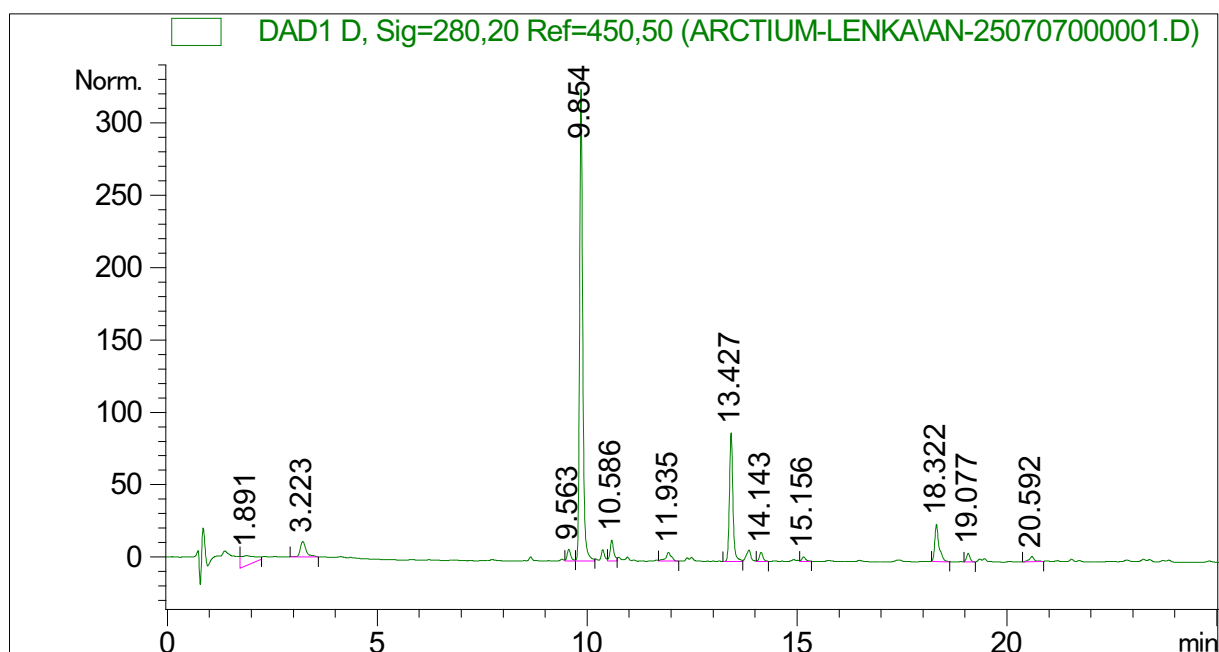
Následně jsme sestavili filtrační aparát a extrakt jsme zfiltrovali do baňky s kulatým dnem. Přebytkého rozpouštědla jsme se zbavili pomocí rotační vakuové odparky tak, aby nám v baňce zůstaly jen samotné vyextrahované látky. Tento proces jsme zopakovali ještě 2x vždy s čerstvým rozpouštědlem, abychom z materiálu vyextrahovali co nejvíce účinných látek. Celkový výtěžek extrakce činil 0,866 g, což odpovídá 10,6 % z navážky použitého rostlinného materiálu.

5.2 Analýza celkového extraktu pomocí HPLC

5.2.1 HPLC-DAD

Připravili jsme vzorek o koncentraci 5 mg/ml, který jsme rozpustili v methanolu a následně podrobili analýze HPLC-DAD (High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection), která slouží k detekci látek, které absorbují UV (ultraviolet) záření.

HPLC-DAD nám zobrazil chromatogram celkového extraktu *A. nemorosum* (obrázek 2) s několika píky s retenčními časy od 3,223 min do 20,592 min. Dominantní pík má retenční čas t_R 9,854 minut, druhý dominantní pík má t_R 13,427 min. Na základě literatury lze předpokládat, že se bude jednat o lignany, které se v rodu *Arctium* nachází.[4]

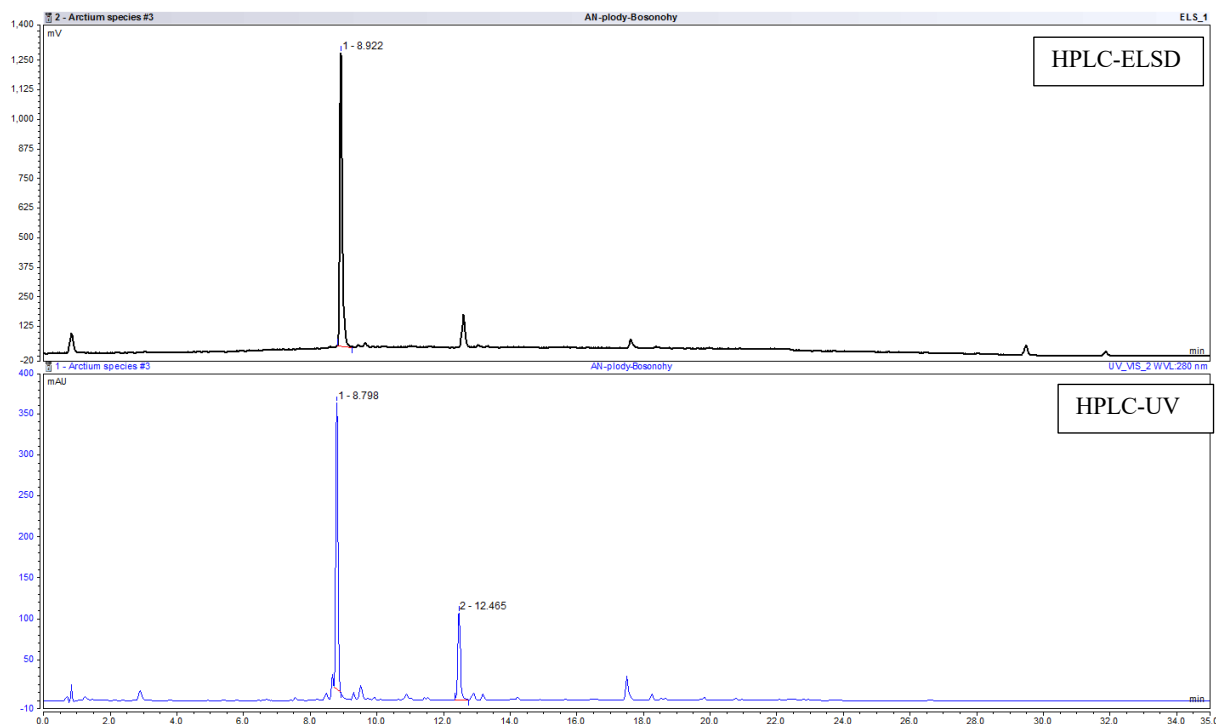


Obrázek 2. HPLC-DAD chromatogram celkového extraktu z plodů *A. nemorosum* při 280 nm

5.2.2 HPLC-ELSD

Abychom detekovali i látky, které se na HPLC-DAD chromatogramu nezobrazily, použili jsme metodu HPLC-ELSD (High-Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection), která zobrazuje i látky bez UV absorpce. Připravili jsme vzorek o koncentraci 5 mg/ml, který jsme rozpustili v methanolu a následně podrobili analýze.

Na chromatogramu celkového extraktu *A. nemorosum* z HPLC-ELSD (obrázek 3) lze vidět několik píků. Vrchní část obrázku 3 zobrazuje látky z celkového extraktu detekované pomocí ELSD, zatímco spodní část obrázku 3 zobrazuje látky detekované UV detektorem. Můžeme si všimnout, že na vrchní části obrázku, tedy na HPLC-ELSD chromatogramu jsou zobrazeny píky s vyššími hodnotami retenčních časů, které nebyly zobrazeny na HPLC-UV chromatogramu. Díky retenčním časům píků lze odhadnout polaritu daných látek. Polární látky mají slabou afinitu ke stacionární fázi, tudíž se budou eluovat dříve a jejich retenční čas bude nízký. Nepolární látky jsou déle zadržovány ve stacionární fázi, eluují se později a jejich retenční čas je vyšší. Na základě literatury můžeme předpokládat, že se bude jednat o mastné kyseliny, vyskytující se v plodech lopuchů.[4]



Obrázek 3. HPLC-ELSD a HPLC-UV chromatogram celkového extraktu z plodů *A. nemorosum*

5.2.3 TLC

K analýze a separaci látek jsme použili metodu TLC (Thin Layer Chromatography). Extrakt jsme nanесли na destičku se silikagelem, a umístili jsme ji do mobilní fáze, složené z chloroformu : metanolu v poměru 93 : 7. Po vyjmutí a vysušení jsme pod UV světlem mohli vidět skvrny, které odpovídají jednotlivým složkám obsažených v extraktu. Skvrny se nacházely v blízkosti startu, ale i od něho vzdálené. Poloha skvrn nám určuje, jak moc jsou látky polární. Látky blízko startu budou polární, silně se navázaly na polární silikagel, pomalu se pohybují nahoru. Nepochární látky se naopak nechají unášet rozpouštědlem a látky se zobrazí od startu vzdáleněji.

5.3 Liquid-liquid extrakce

Liquid-liquid extrakci jsme použili pro oddělení látek v extraktu. Metoda funguje na základě odlišné rozpustnosti látek v nemísitelných rozpouštědlech.

Celkový extrakt jsme rozpustili v 90 ml metanolu a 10 ml destilované vody. Rozpustnost jsme podpořili ultrazvukovou lázní. Následně jsme tuto směs protřepali v dělicí nálevce se 100 ml hexanu a počkali až se rozpouštědla oddělí. Do jedné baňky jsme odpustili metanolovou část a do druhé baňky hexanovou část. K metanolové části jsme znovu přilili 100 ml hexanu a proces jsme zopakovali, aby se látky oddělili co nejlépe. Rozpouštědel z obou baňek jsme se zbavili

pomocí rotační vakuové odparky. Oba tyto výtěžky jsme zlyofilizovali, abychom se zbavili zbývajících rozpouštědla.

Celkový výtěžek látek z hexanového podílu činil 0,235 g, což odpovídá 27,13 % z celkového extraktu.

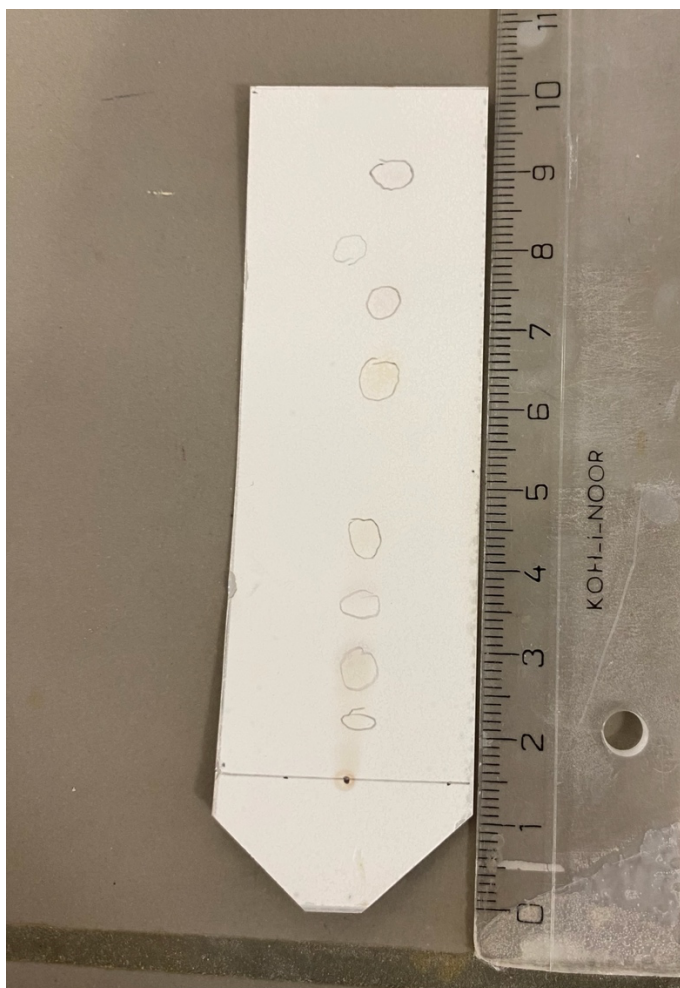
Celkový výtěžek látek z metanolového podílu činil 0,631 g, což odpovídá 72,86 % z celkového extraktu.

5.4 Analýza metanolového podílů

5.4.1 TLC

Z metanolového podílu jsme odvážili 10 mg a rozpustili jsme je v 1 ml mobilní fáze. Jako mobilní fázi pro metanolový podíl jsme zvolili chloroform a metanol, a to v poměru 93 : 7. Na silikagel jsme nanесли 2 kapky vzorku a ponořili jsme ho do mobilní fáze. Po vysušení jsme se podívali na TLC pod UV světlem a zakroužkovali jsme viditelné skvrny. Následně jsme na TLC zlehka nastříkali kyselinu sírovou, aby se nám zobrazili i látky, které neabsorbují UV záření.

Na TLC z metanolového podílu (obrázek 4) můžeme vidět 8 skvrn kulatého tvaru, některé z nich jsou zbarvené do světle oranžové, některé do světle fialové. Skvrny blíže ke startu budou představovat látky, které jsou polární, tyto látky mají tendenci se držet na polární vrstvě silikagelu a pohybují se pomaleji. Zatímco látky nepolární se lépe rozpustí v mobilní fázi a pohybují se rychleji, tudíž budou více vzdálené od startu.

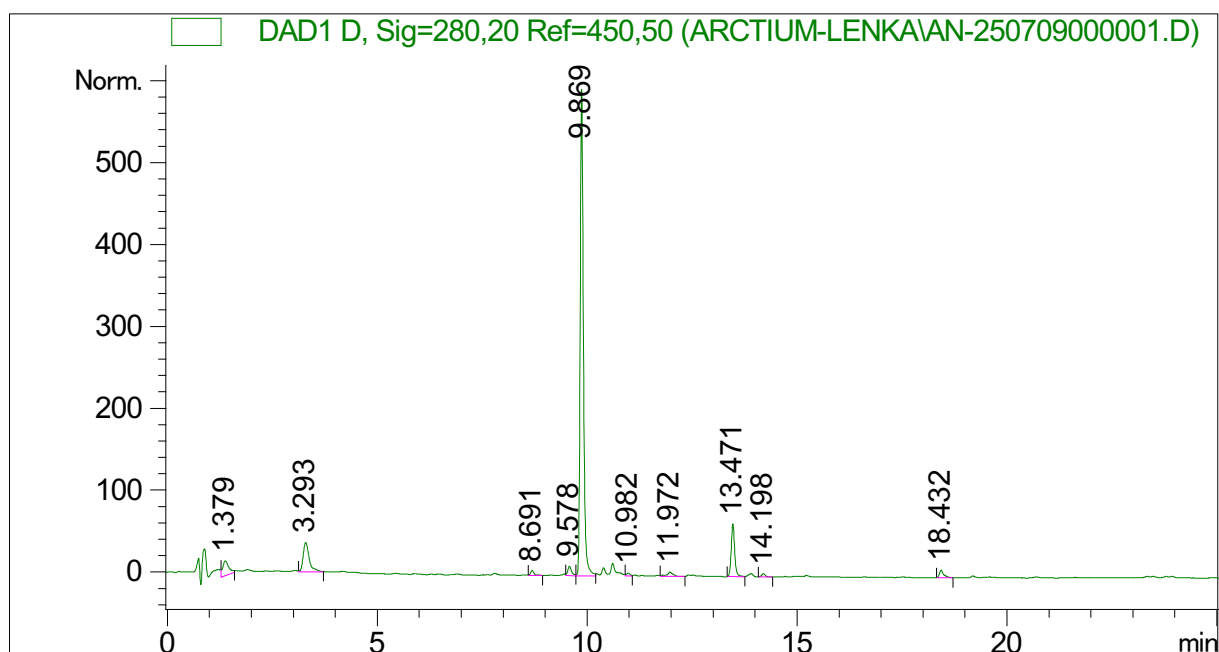


Obrázek 4. TLC metanolového podílu z extraktu plodu *A. nemorosum*

5.4.2 HPLC-DAD

Metanolový podíl jsme zanalyzovali také na HPLC-DAD, abychom mohli později porovnat retenční časy píků se standardy vybraných látek.

Na chromatogramu metanolového podílu (obrázek 5) můžeme vidět několik píků s retenčními časy od 1,379 min do 18,432 min. Lze také vidět dominantní pík s t_R 9,869 min. V porovnání s chromatogramem celkového extraktu (obrázek 2) obsahuje metanolová část pouze polárnější látky, lipofilní látky byly extrahovány a přešly do hexanového podílu.

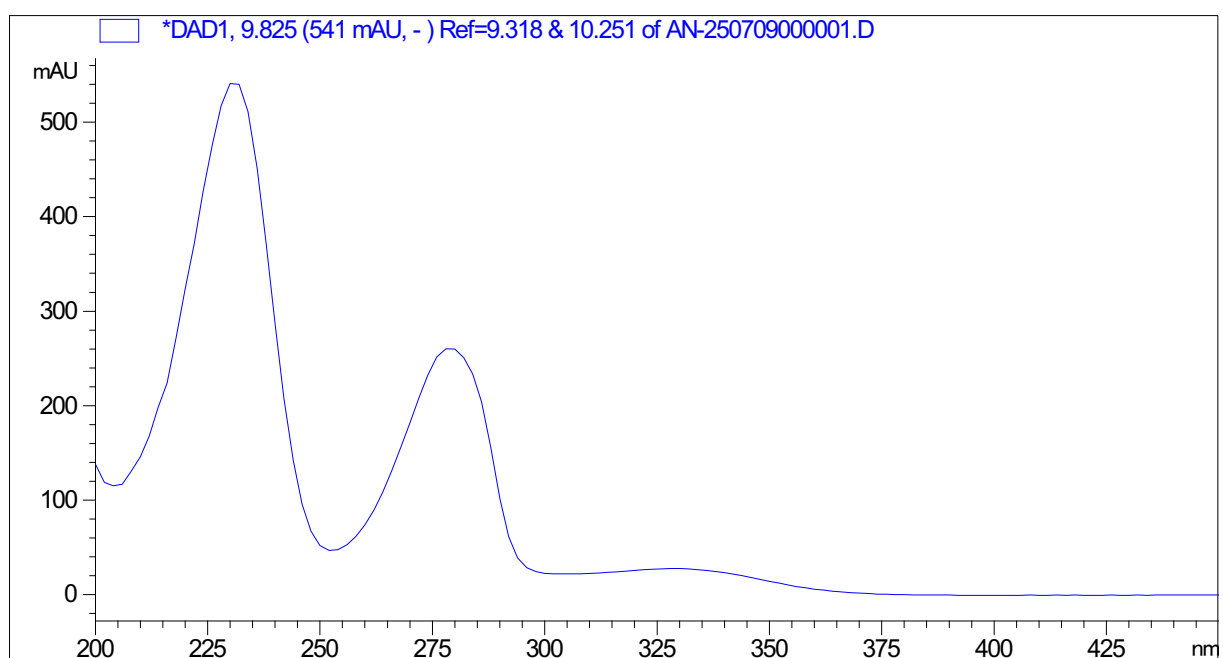


Obrázek 5. Chromatogram metanolového podílu z plodů *A. nemorosum* měřený při vlnové délce 280 nm

5.4.3 Vyhodnocení elektronového spektra

U dominantního píku z chromatogramu metanolového podílu jsme provedli vyhodnocení elektronového spektra, abychom určili jeho maxima a zjistili jeho bližší informace.

Na obrázku 6 je zobrazen dominantní pík, který má tři maxima, a to při hodnotách 230, 278 a 330 nm. Na základě literatury můžeme tvrdit, že se bude jednat o účinnou látku ze skupiny lignanů. UV spektra lignanů rodu *Arctium* mají absorpční maxima v oblastech kolem 220–240 a 280 nm.[19]

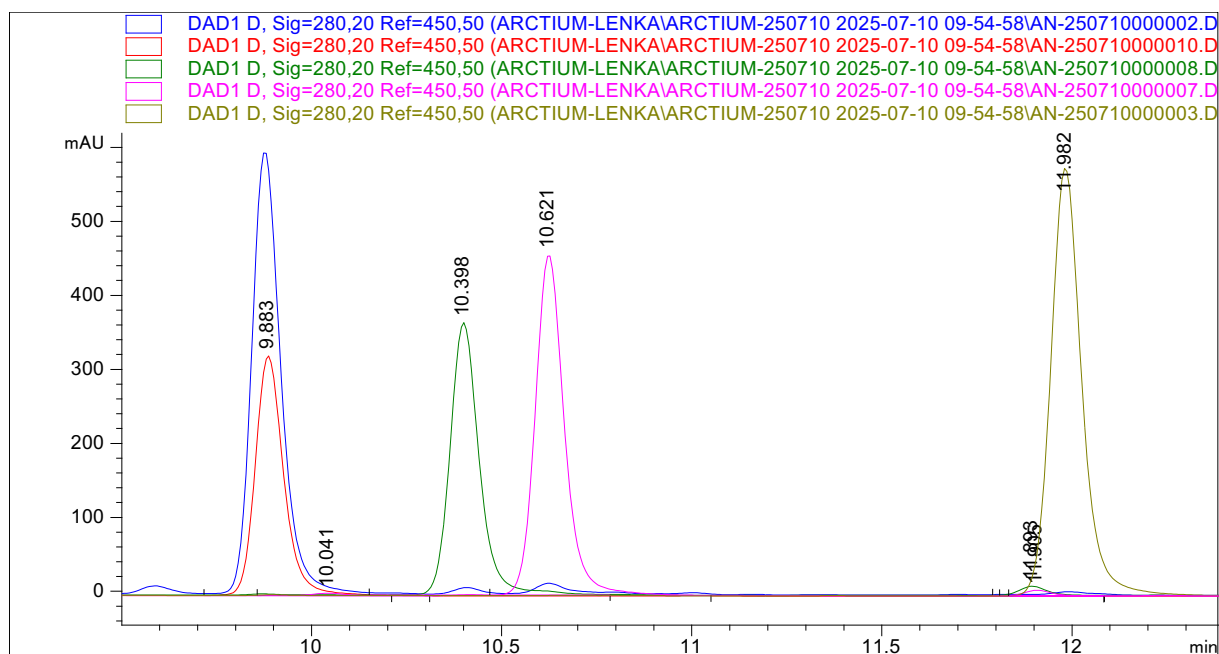


Obrázek 6. Elektronové spektrum dominantního píku z metanolového podílu s t_R 9,869 min

5.4.4 Identifikace látek porovnáním se standardy

K analýze jednotlivých píků jsme si potřebovali změřit hodnoty standardů potenciálních látek obsažených v našem extraktu. Z každé látky jsme si připravili vzorek 1 mg/ml, který jsme rozpustili v metanolu. Naměřené hodnoty standardů jsme následně porovnávali s chromatogramem metanolového podílu. Pro porovnání hodnot byly zvoleny standardy matairesinol, diarcitigenin, arctigenin, lappaol A, lappaol C, isolappaol C, isolappaol A, arctiin. Tyto látky pocházejí ze skupiny lignanů, které patří k jedné z hlavních složek rostlin rodu *Arctium*. [4] Cílem bylo ověřit, zda se některé z těchto látek nachází i v druhu *Arctium nemorosum*.

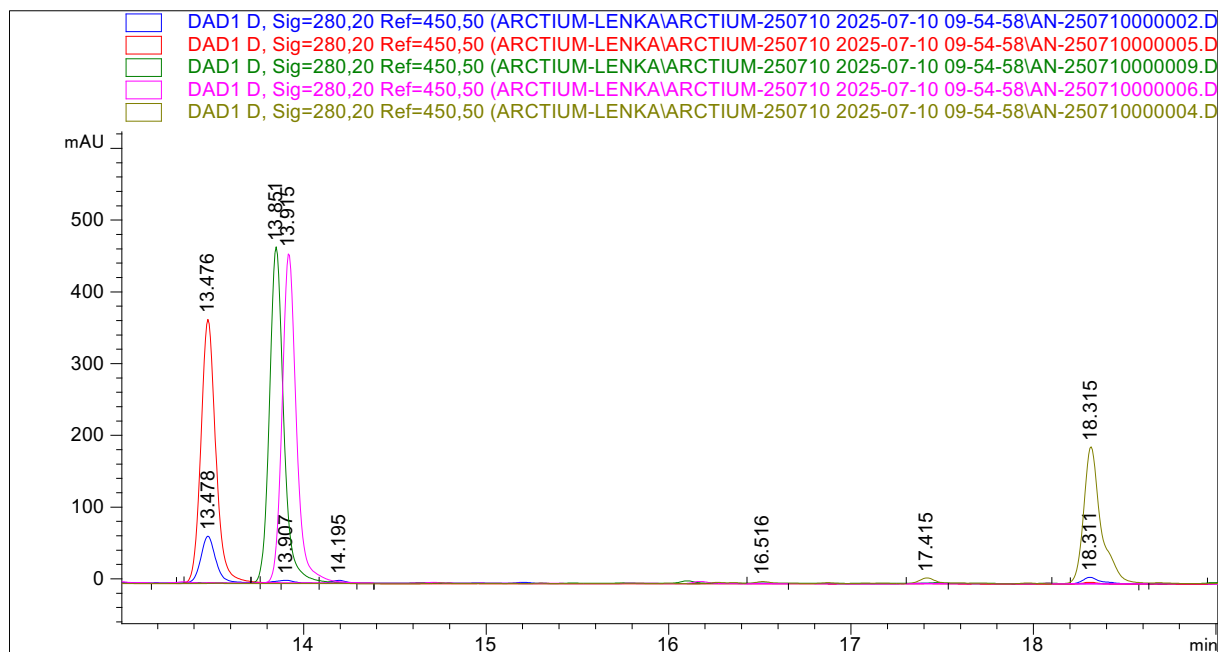
Na obrázku 7 lze vidět část chromatogramu metanolového podílu (9.–12,5. minuta měření), překrytý se čtyřmi naměřenými standardy látek. První pík je dominantním píkem v našem chromatogramu a shoduje se se standardem lignanu arctiinu. Tento pík je dobře oddělen od ostatních, retenční časy se naprosto shodují, proto lze předpokládat, že se jedná o arctiin. Druhý pík překrývající se se standardem isolappaolu C, leží v blízkosti s třetím píkem, který odpovídá lappaolu C. Poslední pík leží odděleně na konci obrázku a odpovídá standardu matairesinolu.



Obrázek 7. Překrytí chromatogramu metanolového podílu (modrá linie) s chromatogramy jednotlivých standardů (červená linie = arctiin, zelená linie = isolappaol C, růžová linie = lappaol C, hnědá linie = matairesinol) měřené při vlnové délce 280 nm)

Obrázek 8 zobrazuje druhou část chromatogramu metanolového podílu (13.–19. minuta měření), překrytý se čtyřmi naměřenými standardy látek. První pík je druhým dominantním píkem v chromatogramu metanolového podílu a odpovídá látce arctigenin. Další pík je

překrýván dvěma naměřenými standardy, které leží v těsné blízkosti, proto se nedá určit, o kterou látku se jedná. Můžeme předpokládat, že by se mohlo jednat o směs dvou látek, a to látek isolappaol A a lappaol A. Poslední pík, který leží oddělený na konci chromatogramu odpovídá látce diartigenin.



Obrázek 8. Překrytí chromatogramu metanolového podílu (modrá linie) s chromatogramy jednotlivých standardů (červená linie = arctigenin, zelená linie = isolappaol A, růžová linie = lappaol A, hnědá linie = diartigenin) měřené ve vlnové délce 280nm

5.5 Analýza hexanového podílu

5.5.1 TLC

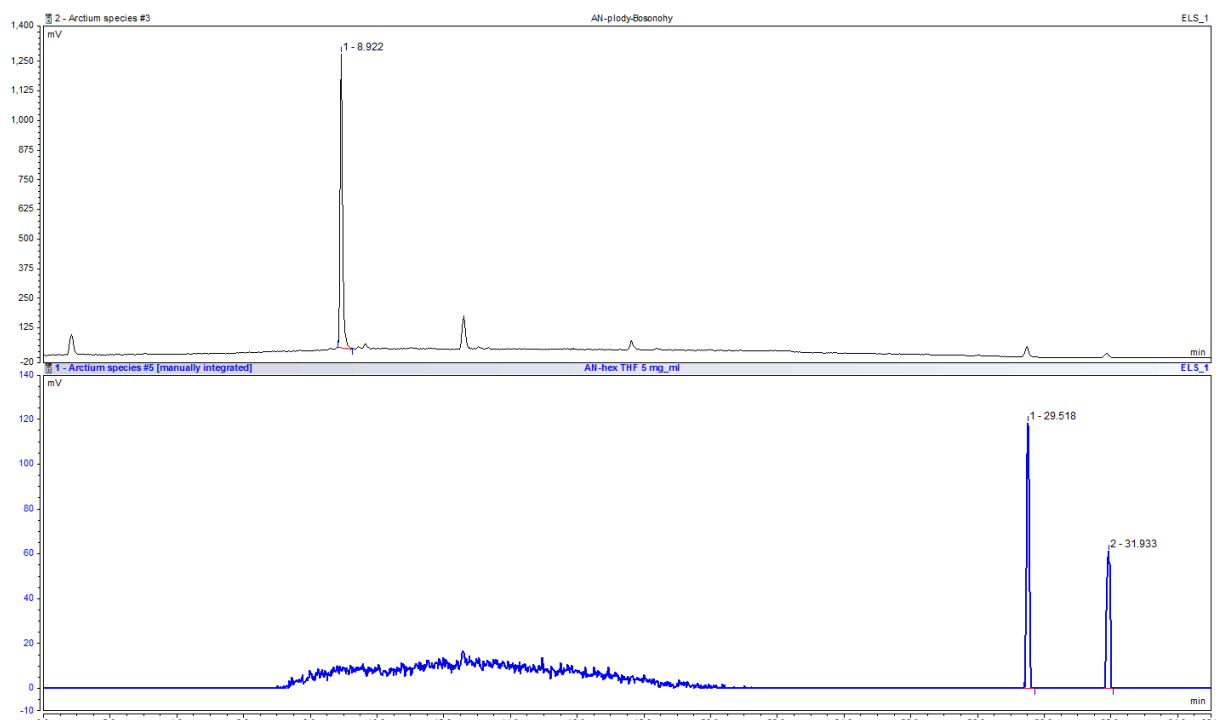
Z hexanového podílu jsme naměřili 10 mg a rozpustili jsme je v 1 ml mobilní fáze. Mobilní fázi pro hexanový podíl tvořil hexan a diethyléter v poměru 80 : 20, k mobilní fázi jsme poté přidali 1 ml kyseliny mravenčí. Provedli jsme stejný postup jako u TLC metanolového podílu. Na destičce silikagelu se nám zobrazily dvě skvrny. Jedna z nich se nacházela poblíž startu, druhá byla méně polární a zachytila se až na vrcholu destičky.

5.5.2 HPLC-ELSD

Z hexanového podílu jsme odvážili 5 mg a rozpustili jsme je v 1 ml tetrahydrofuranu. Vzorek jsme zanalyzovali pomocí HPLC-ELSD.

Na obrázku 9 je znázorněno srovnání chromatogramů celkového extraktu *A. nemorosum* (horní část) a jeho hexanového podílu (dolní část). Chromatogram celkového extraktu obsahuje dominantní pík a několik menších píků v jeho okolí, v závěrečné části jsou také patrné dva další

menší píky. V rodu *Arctium* se nachází i mastné kyseliny, které by se měly držet v hexanovém podílu extraktu, můžeme tak předpokládat, že se bude jednat o nějaký typ těchto kyselin. [4] Tyto píky odpovídají píkům pozorovaným v chromatogramu hexanového podílu, s retenčními časy 29,518 min a 31,933 min.

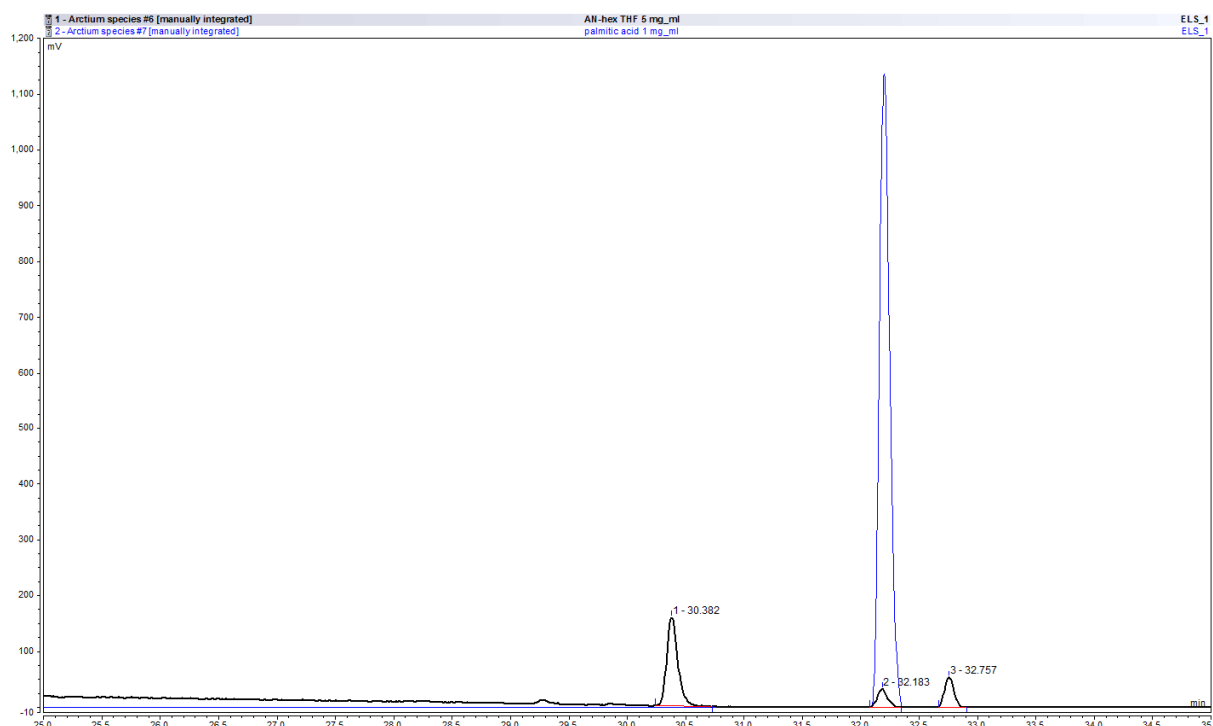


Obrázek 9. Srovnání chromatogramu celkového extraktu (horní část obrázku) s chromatogramem hexanového podílu (dolní část obrázku)

5.5.3 Identifikace látek porovnáním se standardy

Analýza obsažených látek jsme provedli také u hexanového podílu. Změřili jsme hodnoty dvou standardů mastných kyselin – kyseliny palmitové a kyseliny olejové. Standardy jsme připravili v koncentraci 1 mg/ml v tetrahydrofuranu a analyzovali jsme je na HPLC-ELSD. Cílem bylo zjistit typ látky obsažené v hexanovém podílu.

Chromatogram hexanového podílu v časovém intervalu 25.–35. min (obrázek 10), je překrytý se signálem standardu kyseliny palmitové. Kyselině palmitové odpovídá druhý pík v chromatogramu hexanového podílu, tento chromatogram byl také porovnán se standardem kyseliny olejové, avšak žádný z píků tomuto standardu neodpovídal.



Obrázek 10. Překrytí chromatogramu hexanového podílu s chromatogramem standardu kyseliny palmitové

5.6 Kvantifikace látek

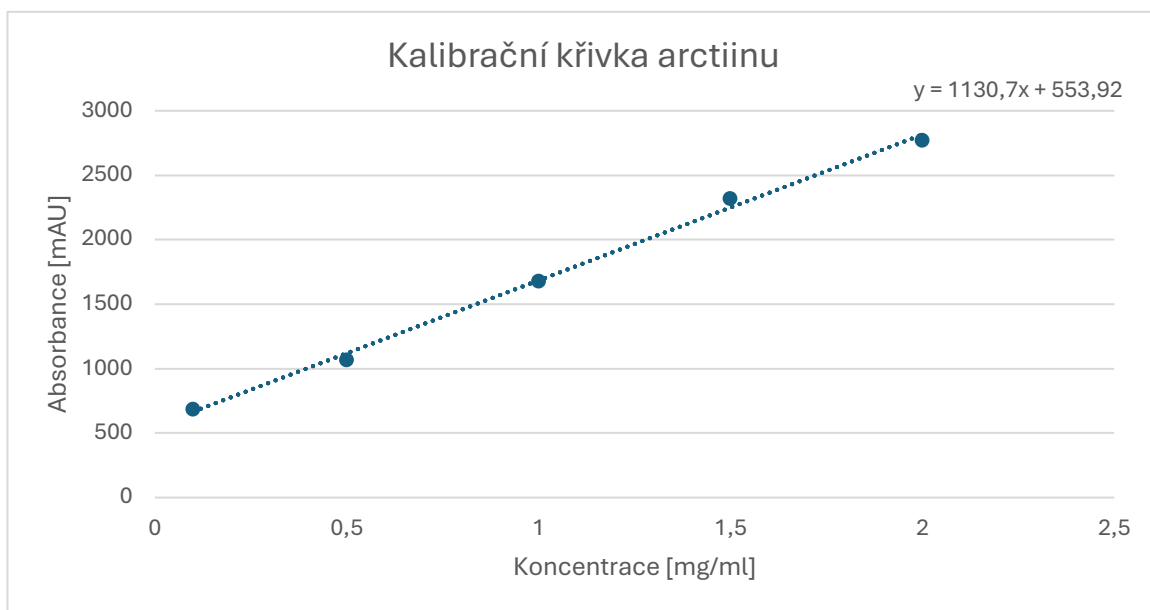
Dalším krokem naší práce bylo kvantifikovat látky obsažené v metanolvém podílu extraktu *A. nemorosum* pomocí kalibrační křivky. Kalibrační křivka v grafu znázorňuje vztah mezi koncentrací látky (osa x) a absorbancí látek v HPLC-DAD (osa y).

Kvantifikovat jsme mohli pouze dva dominantní píky, ostatní látky byly pod limitem kvantifikace.

Připravili jsme si 5 roztoků arctiinu a arctigeninu o různých koncentracích 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 a 2,0 mg/ml, které jsme rozpustili v 1 ml metanolu. Vzorky jsme analyzovali pomocí metody HPLC-DAD a z naměřených hodnot jsme vytvořili graf s kalibrační křivkou. Graf nám zobrazuje kalibrační křivku sekundárního metabolitu.

5.6.1 Arctiin

Graf zobrazuje lineární křivku, která zachycuje nárůst absorpance (obrázek 11). Při koncentraci 0,1 mg/ml je hodnota absorpance 688 mAU a při koncentraci 2 mg/ml je hodnota 2773 mAU. Díky lineární závislosti mezi osou x a y můžeme odečíst neznámou koncentraci látky arctiinu obsažené ve vzorku.



Obrázek 11. Kalibrační křivka arctiinu

Výpočet koncentrace arciinu

Abychom zjistili koncentraci látky obsažené v metanolovém podílu extraktu *A. nemorosum*, museli jsme do rovnice $y = 1130,7x + 553,92$ dosadit za y hodnotu plochy píku s $t_R = 9,869$ min z chromatografu metanolového podílu (obr.5)

$$y = 3214,9$$

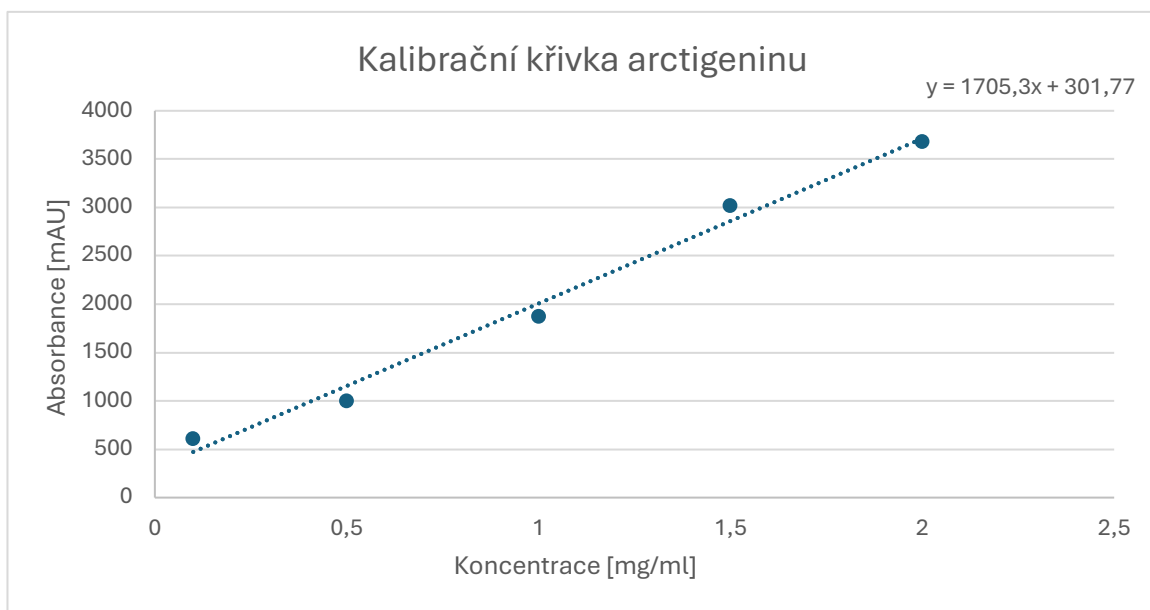
$$y = 1130,7x + 553,92$$

$$x = 2,37$$

Koncentrace arctiinu v extraktu metanolového podílu *A. nemorosum* se rovná 2,37 mg/ml.

5.6.2 Arctigenin

Z grafu, zobrazeného na obrázku 12, můžeme vyčíst lineární vztah osy x a y . Hodnota absorbance při koncentraci 0,1 mg/ml byla 615 mAU a při koncentraci 2 mg/ml došlo k nárůstu absorbance na hodnotu 3683 mAU. Pomocí rovnice, vyplívající z lineární závislosti os, můžeme vypočítat koncentraci arctigeninu v extraktu.



Obrázek 12 Kalibrační křivka arctigeninu

Výpočet koncentrace arctigeninu

Pro získání koncentrace arctigeninu v metanolovém podílu extraktu *A. nemorosum* jsme do vztahu $y = 1705,3x + 301,77$ dosadili za y hodnotu plochy píku s $t_R = 13,471$ z metanolového podílu (obrázek 5).

$$y = 371,5$$

$$y = 1705,3x + 301,77$$

$$x = 0,041$$

Koncentrace arctigeninu v metanolovém podílu extraktu *A. nemorosum* se rovná 0,041 mg/ml.

6 DISKUZE

Hlavním cílem práce bylo zhodnotit druh *Arctium nemorosum* jako potenciální zdroj účinných látek proti onemocnění diabetes mellitus. Z provedené chemické analýzy se potvrdila moje dřívější hypotéza o přítomnosti podobných obsahových látek v druhu *A. nemorosum* jako v jiných druzích rodu *Arctium*, které jsou již v lékařství využívány. Provedením HPLC analýzy a srovnáním chromatografu s naměřenými standardy lignanů, jsme potvrdili výskyt sekundárních metabolitů, konkrétně druhy ze skupiny lignanů a to například lignany arctiin, arctigenin, isolappaol C, lappalo C, matairesinol a další.

Druhy *A. lappa* a *A. minus*, které jsou již v lékařství využívány mají ve svém složení mnoho významných látek.[16] Hlavními zástupci obsahových látek využívaných druhů rodu *Arctium* jsou například lignany, mastné kyseliny, acetylenické sloučeniny, fytosteroly, polysacharidy, flavonoidy a také deriváty kafeoylchinových kyselin.[4] Právě lignany arctiin a arctigenin, které se nachází nejen ve zkoumaném druhu *A. nemorosum* ale i v medicínsky využívaných druhích rodu *Arctium*, jsou považovány za dominantní obsahové látky, které zajišťují významné biologické a farmakologické vlastnosti těchto rostlin. Mezi tyto vlastnosti je zařazen i antidiabetický potenciál.

Mezi obsahově bohaté části rostlin rodu *Arctium* se řadí nejen listy a kořeny, ale řadu bioaktivních metabolitů obsahují i plody nebo semena. U druhu *A. lappa* je ale za nejhodnotnější část rostliny považován kořen, i když celá rostlina vykazuje řadu biologicky aktivních látek.[16] Nejen kořeny rostlin rodu *Arctium* vykazují antidiabetické účinky, skupina látek, která tuto schopnost má se nachází i v semenech rostlin. Do skupiny látek vykazující antidiabetický účinky se řadí hlavně již zmiňované lignany, mastné kyseliny a další sekundární metabolity. Možnost využití i těchto látek ze semen rostlin, a nejen z kořenů by mohla udávat další směr pokračování výzkumu.

V dostupné literatuře jsou sledovány a popisovány rozdíly obsahu u druhů *A. lappa*, *A. minus* a *A. tomentosum*, avšak druh *A. nemorosum* nebyl do porovnání zahrnut.[20] Z tohoto důvodu je přímé porovnávání s publikovanými daty omezené a interpretace výsledků musí být prováděna s určitou opatrností. Literatura se zabývá porovnáváním obsahových látek v kořenech druhů *Arctium*. Studie zmiňuje přítomnost některých mastných kyselin, například kyseliny palmitové, palmitolejové, linolové, olejové.[20] Kyselina palmitová, která byla přítomna v kořenech druhů, byla rovněž identifikována v našem zkoumaném druhu *A. nemorosum*. Tento fakt naznačuje, že *A. nemorosum* sdílí některé chemické charakteristiky s ostatními druhy a mohl by se stát dalším zdrojem účinných látek.

Součástí práce byla také kvantifikace dominantních látek, tedy přesněji lignanů arctiin a arctigenin. Díky chemickým analýzám ostatních druhů můžeme jednotlivé kvantifikace mezi sebou porovnat.

Z výsledků víme, že koncentrace arctiinu v druhu *A. nemorosum* se rovná 2,37 mg/ml to představuje se srovnáním výsledků kvantifikace z diplomové práce Jitky Křížové až dvojnásobně větší koncentraci lignanu arctiinu než v ostatních druhích rodu *Arctium*. [21]

Koncentrace lignanu arctigeninu ve zkoumaném druhu *A. nemorosum* se rovná 0,041 mg/ml tato hodnota je s ostatními druhy rodu podobná, vyskytují se zde i malé rozdíly kdy koncentrace arctigeninu v *A. nemorosum* je dvojnásobně větší nebo dvojnásobně menší.[21]

Odborná literatura, která se zabývá porovnáním metabolických profilů druhů rodu *Arctium* naznačuje, že množství lignanů může být také ovlivněno růstovými podmínkami v roce sběru, což může vysvětlovat rozdíly v koncentracích. Podle publikovaných literárních dat byl obsah arctiinu ve sledovaném období vyšší v druhu *A. lappa*, a naopak obsah lignanu arctigeninu byl vyšší v druhu *A. minus*. [8] V mém zkoumaném druhu, *A. nemorosum*, byla vyšší koncentrace arctiinu a nižší koncentrace arctigeninu podobně jako v *A. lappa*. To by mohlo podpořit myšlenku vzájemné záměny těchto druhů.

Rozdílná koncentrace látek v různých druzích může být zapříčiněna nejen růstovými podmínkami, ale také typem stanoviště, na kterém rostlina rostla. Na koncentraci mohou mít vliv také výrazné teplotní výkyvy nebo množství srážek. Důležitým faktorem pro množství koncentrace je také druh rodu, některé druhy budou přirozeně obsahově bohatší nebo kvalitnější. Z dosud získaných výsledků můžeme ale tvrdit, že zkoumaný druh *A. nemorosum* byl co se týče koncentrací látek, především lignanu arctiinu, bohatší než ostatní zkoumané druhy v diplomové práci, ze které jsme vycházeli.[21]

Druh *A. nemorosum* je dostatečně neprozkoumaný druh a v budoucnu by se mohlo jednat o významný druh, který se bude v lékařství běžně využívat pro terapeutické účinky. Tato práce je jedinou studií, která se zabývá analýzou tohoto druhu, a to je také limitující faktor pro dostatečné srovnání a zhodnocení. Limitací práce může být také omezený počet analyzovaných vzorků a zaměření analýzy pouze na vybrané lignany a nezahrnuje tak kompletní spektrum sekundárních metabolitů druhu *A. nemorosum*. Také zmiňovaná variabilita použitého rostlinného materiálu hraje velkou roli, tedy podmínky růstu, stáří rostliny, část rostliny a lokalita. Byla prováděna pouze chemická analýza nikoli přímé testování na biologickou aktivitu extraktu.

Do budoucna by druh *A. nemorosum* mohl představovat nejen širší zdroje lignanů pro aktuálně používané terapeutické účinky při léčbě onemocnění diabetes mellitus, ale také by mohl být používán při výrobě nových přírodních léčiv, které jsou stále častěji vyhledávány nejen doktory, ale hlavně pacienty. Práce nám přinesla nový pohled na zdroj nejen antidiabetických látek ale i nové možnosti využití rodu ve farmakologii nebo kosmetologii.

Žádoucím krokem bude pokračování ve výzkumu druhu *A. nemorosum* a zajistit další experimentální a klinické studie, které nám mohou přinést bližší poznání tohoto druhu a potvrdit tak jeho významný potenciál pro budoucí využití v medicíně.

7 ZÁVĚR

Hlavním cílem práce bylo provést fytochemickou analýzu dosud nedostatečně prozkoumaného druhu *Arctium nemorosum* a zhodnotit jeho potenciál jako zdroj bioaktivních látek při léčbě onemocnění diabetes mellitus.

Provedená analýza potvrdila přítomnost sekundárních metabolitů, které se vyskytují v terapeuticky využívaných antidiabetických prostředcích. Důležitým poznatkem práce bylo porovnání kvantifikací vybraných lignanů arctiinu a arctigeninu. Z porovnání koncentrací vyplynulo, že zkoumaný druh *A. nemorosum* je bohatým zdrojem těchto dvou lignanů. Tyto lignany jsou významné ve farmakologii, především v kontextu hledání nových léčiv.

Tento druh může představovat další zdroj sekundárních metabolitů a jiných bioaktivních látek, které jsou pro medicínu důležité. Limitem práce je však nedostatek odborných studií a analýz tohoto druhu. Na základě dostupných poznatků lze považovat *A. nemorosum* za významný přírodní zdroj bioaktivních látek, které by si zasloužily větší pozornost a provedení detailnější analýzy.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] FABRICANT, D S a N R FARNSWORTH. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2001, **109**(Suppl 1), 69–75. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.01109s169
- [2] BALWAN, Wahied Khawar a Sachdeep KOUR. Lifestyle Diseases: The Link between Modern Lifestyle and Threat to Public Health. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences* [online]. 2021, **7**(4), 179–184. ISSN 24134929, 24134910. Dostupné z: doi:10.36348/sjimps.2021.v07i04.003
- [3] AGUIRRE, Florencia, Alex BROWN, Niam Han CHO, Gisela DAHLQUIST, Sheree DODD, Trisha DUNNING, Michael HIRST, Christopher HWANG, Dianna MAGLIANO, Chris PATTERSON, Courtney SCOTT, Jonathan SHAW, Gyula SOLTESZ, Juliet USHER-SMITH a David WHITING. *IDF Diabetes Atlas: Sixth edition*. B.m.: International Diabetes Federation, 2013. ISBN 978-2-930229-85-0.
- [4] WANG, Dongdong, Alexandru Sabin BĂDĂRAU, Mallappa Kumara SWAMY, Subrata SHAW, Filippo MAGGI, Luiz Everson DA SILVA, Víctor LÓPEZ, Andy Wai Kan YEUNG, Andrei MOCAN a Atanas G. ATANASOV. Arctium Species Secondary Metabolites Chemodiversity and Bioactivities. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2019, **10** [vid. 2026-02-07]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2019.00834
- [5] LI, Zheng, Zhiyuan ZHANG, Jie DING, Yuanyuan LI, Guiyun CAO, Lihao ZHU, Yifei BIAN a Yuhong LIU. Extraction, structure and bioactivities of polysaccharide from root of *Arctium lappa* L.: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2024, **265**, 131035. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.131035
- [6] HAMAROVÁ, Veronika. *Izolácia a identifikácia obsahových látok Arctium species s potenciálnou antidiabetickou aktivitou* [online]. B.m., 2023 [vid. 2026-02-07]. b.n. Dostupné z: <https://opac.crzp.sk/?fn=detailBiblioForm&sid=7337784199D0E1551A6FE00968E8>
- [7] ROLNIK, Agata a Beata OLAS. The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(6) [vid. 2026-02-07]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22063009
- [8] MALANÍK, Milan, Veronika FARKOVÁ, Jitka KŘÍŽOVÁ, Alice KRESOVÁ, Karel ŠMEJKAL, Tomáš KAŠPAROVSKÝ a Kateřina DADÁKOVÁ. Comparison of Metabolic Profiles of Fruits of *Arctium lappa*, *Arctium minus*, and *Arctium tomentosum*. *Plant Foods for Human Nutrition* [online]. 2024, **79**(2), 497–502. ISSN 1573-9104. Dostupné z: doi:10.1007/s11130-024-01175-w
- [9] WILCOX, Gisela. Insulin and Insulin Resistance. *Clinical Biochemist Reviews*. 2005, **26**(2), 19–39. ISSN 0159-8090.
- [10] General aspects of diabetes mellitus. In: *Handbook of Clinical Neurology* [online]. B.m.: Elsevier, 2014 [vid. 2026-02-07], s. 211–222. ISSN 0072-9752. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-53480-4.00015-1

- [11] PASCHOU, Stavroula A., Nektaria PAPADOPOULOU-MARKETOU, George P. CHROUSOS a Christina KANAKA-GANTENBEIN. On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocrine Connections* [online]. 2018, 7(1), R38–R46. ISSN 2049-3614. Dostupné z: doi:10.1530/EC-17-0347
- [12] OLOKOBA, Abdulfatai B., Olusegun A. OBATERU a Lateefat B. OLOKOBA. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Medical Journal* [online]. 2012, 27(4), 269–273. ISSN 1999-768X. Dostupné z: doi:10.5001/omj.2012.68
- [13] MCINTYRE, H. David, Patrick CATALANO, Cuilin ZHANG, Gernot DESOYE, Elisabeth R. MATHIESEN a Peter DAMM. Gestational diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. 2019, 5(1), 47. ISSN 2056-676X. Dostupné z: doi:10.1038/s41572-019-0098-8
- [14] BUCHANAN, Thomas A. a Anny H. XIANG. Gestational diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. 2005, 115(3), 485–491. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI24531
- [15] MONDAL, Shakti Chandra a Jong-Bang EUN. Mechanistic insights on burdock (*Arctium lappa* L.) extract effects on diabetes mellitus. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2022, 31(8), 999–1008. ISSN 2092-6456. Dostupné z: doi:10.1007/s10068-022-01091-2
- [16] SHYAM, Mukul a Evan Prince SABINA. Harnessing the power of *Arctium lappa* root: a review of its pharmacological properties and therapeutic applications. *Natural Products and Bioprospecting* [online]. 2024, 14(1), 49. ISSN 2192-2209. Dostupné z: doi:10.1007/s13659-024-00466-8
- [17] LEE, Dong-Hyo, Eun-Sung SEO, Jin-Tae HONG, Gang-Tai LEE, Young-Kyoung YOU, Kun-Kook LEE, Ga-Won JO a Nam-Kwen KIM. The efficacy and safety of a proposed herbal moisturising cream for dry skin and itch relief: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial- study protocol. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2013, 13(1), 330. ISSN 1472-6882. Dostupné z: doi:10.1186/1472-6882-13-330
- [18] GOWHER GUNA. THERAPEUTIC VALUE OF ARCTIUM LAPPA LINN. – A REVIEW. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* [online]. 2019, 53–59. ISSN 2455-3891, 0974-2441. Dostupné z: doi:10.22159/ajpcr.2019.v12i7.33870
- [19] LIU, Jingyi, Yi-Zhong CAI, Ricky Ngok Shun WONG, Calvin Kai-Fai LEE, Sydney Chi Wai TANG, Stephen Cho Wing SZE, Yao TONG a Yanbo ZHANG. Comparative Analysis of Caffeoylquinic Acids and Lignans in Roots and Seeds among Various Burdock (*Arctium lappa*) Genotypes with High Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, 60(16), 4067–4075. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf2050697
- [20] OPROSHANSKA, Tetiana, Olga KHVOROST, Kateryna SKREBTSOVA, Lesia SAVCHENKO a Natalya FIZOR. Comparative pharmacognostic study of the roots of the most common species of plants of the genus *arctium*. *ScienceRise: Pharmaceutical Science* [online]. 2024, (3 (49)), 54–62. ISSN 2519-4852. Dostupné z: doi:10.15587/2519-4852.2024.307262

- [21] KŘÍŽOVÁ, Jitka. *Fytochemická profilace extraktů z různých částí Arctium species* [online]. B.m., 2023 [vid. 2026-02-02]. Masarykova univerzita, Farmaceutická fakulta. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/bn69e/Diplomova_prace_Krizova.pdf?info=1;zpet=https:%2F%2Ftheses.cz%2Fvyhledavani%2F%3Fsearch%3Darctium%26start%3D1

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DAD - diode-Array Detection

ELSD - evaporative Light Scattering Detection

HPLC - high-Performance Liquid Chromatography

TLC - thin-Layer Chromatography

UV - ultraviolet