

**STUDIUM ANTIOXIDAČNÍHO POTENCIÁLU A ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITY
EXTRAKTŮ PLODŮ JEDLÉHO ZIMOLEZU (*LONICERA EDULIS* TURCZ. EX
FREYN), (*LONICERA KAMTSCHATICA* L.) A JEJICH HYBRIDŮ
STUDING OF ANTIOXIDATION POTENCIAL AND ANTIMICROBIAL ACTIVITI OF
EXTRACT OF *LONICERA EDULIS* TURCZ. EX FREYN, *LONICERA KAMTSCHATICA* L.
AND THEIR'S HIBRIDES**

**Salaš P.¹, Sochor J.¹, Gazdík Z.^{1,2,3}, Adam V.^{2,4}, Kalhotka L.³, Zítka V.², Szostková M.³,
Diopan V.², Juríková – Pokorná T.⁵, Šaloun J.⁶, Beklová M.⁷, Frolková P.⁸, Kizek R.^{2*}**

¹ Ústav šlechtění a množení zahradnických rostlin, Zahradnická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Valtická 337, 69144 Lednice, Česká republika

² Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

³ Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

⁴ Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

⁵ Inštitút prírodných a informačných ved, Fakulta stredo- európskych štúdií, Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Nábřežie Mladých 24, 949 76 Nitra, Slovensko

⁶ Ústav aplikované farmacie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická fakulta Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika

⁷ Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická fakulta Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika

⁸ Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika

* Korespondenční autor: Doc. Ing. René Kizek, Ph.D.

Email: kizek@sci.muni.cz, Tel: +420 545133350, Fax: +420 545212044

Summary

Among the foodborne diseases, bacterial infections have been previously thought to be eliminated by the end of last century. Keeping in timeline of several past decades, both chronic gastrointestinal infection such as food intoxication are growing public health problem worldwide. From the environment, microbial contamination may enter the agric-food chain via crops such as fruits or vegetable and cause two types of food poisoning. Although natural products are susceptible to contamination during growth, harvest, and post-harvest processes, antimicrobial properties of several antioxidant-rich plant foods have been described. Among the neglected or underutilized crops, many of less common fruit species meets this regard. The purpose of the study was to investigate antibacterial activity of fruit juice obtained from Blue Honeysuckles (*Lonicera kamtschatica* L.), (*Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn) such as their interspecific hybrids against two bacterial strains. (*E. coli*), and (*Salmonella enterica*) a causative agents in foodborne problems, were routinely maintained at 37°C. A sensitivity test was carried out on agar cultures by application of paper discs (1 mm in diameter) impregnated with 0.1 and 1 ml of fresh juice. Following 24 hour exposure, anti-bacterial activity was measured and expressed in terms of the diameter of zone of inhibition. Furthermore, HPLC-ED profile of the fruit samples was investigated to find out a relationship between antioxidant and antibacterial properties. Finally, data from both experimental and analytical measurements were applied to Pearson's chi-squared test. Resulting correlation coefficient indicated a statistically significant linear relationship between total phenolic content (mg.100 g⁻¹) and antibacterial activities against (*E. coli*) and (*Salmonella*). However various parts of *Lonicera* shrub had been utilized in urban medicine for many decades, only recently, several phenolic matrix constituents have been suggested as the main compounds response for the health benefits of Blue Honeysuckles. With respect to emerging burden of food-borne

problems, it is widely accepted that there is an urgent need for diet with specific antimicrobial properties to prevent food-borne diseases. Based on our results, antioxidant formation observed in Blue Honey berries may inhibit growth of examined both gram-negative bacterial strains.

Key words: *Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn, *Lonicera Kamtschatica* L., HPLC-ED, TAC - CoulArray, DPPH test, *E. coli*, *Salmonella*

Epidemiologický profil infekčních onemocnění přenášených potravou se v chronologii současné etapy neustále mění [1]. V posledních dekádách minulého století existoval předpoklad, že gastrointestinální infekce přenášené alimentární cestou budou eliminovány. V současnosti, infekční komplexita mikrobiálních patogenů, stejně jako jejich adaptabilita a schopnost způsobovat akutní, ale v některých případech i chronické (sekundární) infekce, představuje problematiku, výrazně ovlivňující zdraví a welfare stávající populace [2]. Aktuální počet úmrtí způsobených mikrobiální kontaminací vody a potravin koresponduje s počtem 2,2 miliónu úmrtí ročně, přičemž 86,36 % z tohoto počtu tvoří děti [3]. Mikrobiální kontaminanty a toxické produkty jejich metabolismu pronikající k člověku, mohou být nejen přímou příčinou řady infekčních onemocnění, ale současně i nositeli determinant rezistence k formulacím současných antibiotik. Výsledky epidemiologických studií WHO, FAO a OIE [4] potvrzují fakt, že zvýšený výskyt kmenů s atypickými mechanismy rezistencí je fenoménem, determinujícím vzrůstající počty pacientů v oblasti gastrointestinálních onemocnění přenášených potravinami. V roce 1940 [5], byla poprvé u izolátu (*Escherichia coli*) popsána penicilináza, první objevená β -laktamáza schopna hydrolyzovat β -laktamový kruh penicilinu i jiných β -laktamových antibiotik. V následujících desetiletích problematika antibiotické rezistence nabyla celosvětového významu a přístup k antibiotikům musel být přehodnocen. Byly vypracovány strategie racionální antimikrobiální terapie, omezeno profylaktické užívání antibiotik a používání těchto látek jako růstových stimulátorů. Přesto je v současné době celosvětově pozorován zvyšující se výskyt rezistentních bakterií k antimikrobiálním přípravkům, který následně představuje vážný problém při terapii infekčních onemocnění i v epidemiologické praxi. *Escherichia coli*, serotyp O157:H7, způsobující hemoragickou kolitidu, byl poprvé popsán v roce 1982 [6]. Epidemiologický význam akutního průjmového bakteriálního onemocnění je dán především serotypy *E. coli* produkujícími verotoxiny (shigatoxiny). Společně s patogeními serotypy (*Salmonella*) [7], patří v problematice rezistence vůči antibiotikům k nejsledovanějším.

Význam výživy v souvislosti s infekčním onemocněním nejen trávicího traktu je dnes z obecného hlediska nepochybně široce akceptován. Možnost využití antioxidantů jakožto perspektivních antibakteriálních látek, je založena na průkazné korelaci oxidativního poškození a imunopatologických procesů exponovaných tkání s indukcí gastrointestinálních infekcí. V této souvislosti byla prokázána úzká souvislost mezi antioxidační aktivitou a zastoupením fenolických látek v ovoci [8]. Přestože Wild a Fasel [9] objevili v roce 1969 silný antibakteriální efekt u některých neglykosilovaných flavonů, skupinu flavonolů, stejně jako flavolignany, shledali jako látky, bez inhibiční aktivity vůči spektru testovaných bakterií. Fenolické antioxidanty se ve značné míře nacházejí v ovoci, přičemž jejich vysoké koncentrace byly nalezeny v produktech alternativních komodit rostlinné produkce a v méně pěstovaných ovocných druzích [10].

Zimolez jedlý - (*Lonicera edulis*, Turcz. ex. Freyn), (*Lonicera kamtschatica* L.) je v našich podmínkách poměrně novým ovocným druhem, který poskytuje jedlé a cenné drobné ovoce s mimořádně časným dozráváním plodů. V rozsáhlém rodu zimolezů (*Lonicera*), zastoupených téměř 180 druhy rozšířenými v zóně mírného pásma severní polokoule, se nachází převážná většina s významnou okrasnou hodnotou. Druhy využívané v ovocnářství, jsou společně označovány jako „kamčatské borůvky“, které mají plody příjemně sladké někdy

i s mírnou nahořklostí. Plody zimolezu obsahují v závislosti na druhu a pěstitelských podmínkách 10 – 14 % sušiny, 3 – 13 % cukrů, 1,1 – 1,6 % pektinů, 20 – 50 mg · 100 g⁻¹ vitamínu C, významně jsou zastoupeny rovněž rostlinných fenolů. Celkový obsah flavonoidů v plodech dosahuje 70 mg · 100 g⁻¹, významně je zastoupen rutin [11].

Cílem studie bylo hodnocení a preklinické testování biologicky aktivních látek schopných zhášení ROS, obsažených v extraktech plodů (*Lonicera kamtschatica* L.), (*Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn) a jejich interspecifických hybridů, ve vztahu k antimikrobiální aktivitě. Parciální cíle studie byly vztaheny k výzkumu strukturních aspektů zkoumaných nutraceutik (fenyلكarboxylových kyselin a polycyklických hydroxylovaných uhlovodíků s nízkou molekulovou hmotností).

Materiál a metody

Chemikálie: byly použity standardy fenyلكarboxylových kyselin o HPLC čistotě: kyselina galová, kyselina 4-aminobenzoová, kyselina salicylová, kyselina chlorogenová a flavonoidů: chrysin, (Sigma Aldrich Corp., USA), rutin trihydrát a quercitrin dihydrát (Roth GmbH, Karlstruhe, Germany), quercetin, diosmin (Merck, Darmstadt, Germany), katalposid, resveratrol (Sigma-Aldrich Fluka Co. St. Louis. MO, USA). Methanol (>99.9 %; v/v), kyselina octová a kyselina mravenčí pro HPLC. Tekutý dusík, 96% ethanol (Dr. Kulich Pharma Czech Republic). Zásobní roztok 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl DPPH[•], acetonitril pro HPLC (Sigma Aldrich, Chemical Corp. St. Louis, USA), ostatní analytická činidla ACS čistoty (Sigma Aldrich, Chemical Corp. St. Louis, USA)

Laboratorní a přístrojové vybavení pro stanovení HPLC profilů a antioxidačního potenciálu vzorků: HPLC-ED systém I: Isokratický HPLC-ED systém byl složen z jedné solventní chromatografické pumpy pump (ESA Inc., Model 582, Chelmsford, MA, USA), a guard cell (ESA Inc., Model 5020), a chromatografické kolony Restec Allure, (Metachem, Canada), reversní-fáze (150.0 × 4.6 mm, o velikosti sorpčních částic 5 μm,) a elektrochemického detektoru. Amperometrický detektor zahrnoval jednu nízkonapěťovou průtočnou analytickou celu (ESA Inc., Model 5040), ta obsahovala pracovní sklo-uhlíkovou elektrodu, referenční hydrogen-paladiovou elektrodu, pomocnou uhlíkovou elektrodu a Coulochem III®, jako kontrolní modul. Vzorky (5 μL) byly injektovány automaticky (ESA Inc., Model 540 Microtiter HPLC). Výstupní data byla zpracována aplikací CSW 32 software (Version 1.2.4, Data Apex, Czech Republic). Potenciál ochranné cely byl nastaven na 0 V. Pracovní elektroda byla obnovována mechanicky hliníkovým filmem o mocnosti 0.1 μm (ESA Inc.) a ve sledu sonifikována při pokojové teplotě po dobu 5 min. (Sonorex Digital10 P Sonicator, Bandelin, Berlin, Germany) při 40 W.

HPLC-ED systém II: 2 chromatografické pumpy Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA), autosampler Model 542 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA, USA), vakuový degaser (Shimadzu corp., Japan), chromatografická kolona s reversní fází Zorbax C18-AAA (150 x 4,6 mm, velikost částic 3,5 μm, Aglient technologies, USA), dvanácti-kanálový elektrochemický detektor CoulArray® (Model 5600A, ESA, USA), s průtočnou analytickou komůrkou (Model 6210, ESA, USA).

Automatizovaný spektrofotometrický analyzátor BS-200 (Mindray, China), centrifuga (Eppendorf 5804R, Germany), filtrační teflonové disky 0,45 μm, (Metachem, Torrance, CA, USA). Reagencie a vzorky byly uloženy v chlazeném karuselu při teplotě 4 °C a automaticky pipetovány do plastických kyvet. Inkubace probíhala při teplotě 37 °C. Nejprve byla pipetována reagencie tvořená roztokem DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) v ethanolu o koncentraci 9.5 · 10⁻⁵ mol · l⁻¹ (450 μl), po 4 minutách bylo pipetováno 5 μl vzorku. Výsledný roztok byl homogenizován. Změna absorbance byla snímána po dobu 21 minut v intervalu

16 sekund od smíchání činidel při vlnové délce 510 nm a optické dráze 5 mm. Relativní antioxidační kapacita byla vyjádřena procentem poklesu absorbance původního roztoku podle následujícího vztahu: $(\% = 100 - ((A_{t \text{ po } 21 \text{ minutách}} / A_{t 0}) * 100)$

Biologické vzorky: byly použity následující plody: 2 genotypy zimolezu jedlého (*Lonicera kamtschatica*, L.): L – Kl – 2, L – Kl – 21, vypěstované na genofondových plochách SPU Nitra, 1 odrůda (*Lonicera edulis* Turtz. Ex Freyn): Bakcarskaja a hybridní odrůda Altaj (*L. kamtschatica* x *L. Turczaninowii*), sklizených na genofondových plochách MZLU v Brně. Plody byly sklizeny ve druhé polovině měsíce května a zamraženy při teplotě - 80 °C, po dobu 10 měsíců.

Příprava biologických vzorků: plody stanovených odrůd a genotypů byly rozmraženy za pokojové teploty. 5 g navážky plodů byly odváženy s přesností na 4 desetinná místa, převedeny do třecích misek, zamraženy dusíkem a za tmy, při teplotě 4 °C, homogenizovány s 5 ml 96 % ethanolu (pro spektrofotometrické stanovení) a 5 ml 99 % methanolu_{aq} (pro stanovení HPLC). Homogenizované vzorky byly kvantitativně převedeny do zkumavek a za stejných laboratorních podmínek byly ponechány 30 minut na třepačce. Následovala sonifikace a centrifugace po dobu 30 minut při 16400 ot. / min. Supernatanty byly filtrovány přes teflonové membránové disky (0,45 µm). 150 µl z každého filtrátu bylo odpipetováno a doplněno 150 µl ethanolu/methanolu.

Chemikálie: kyselina nalidixová, (Oxoid, Ltd, Basinstoke, Great Britain), Cefatoxime - Claforan® (Laboratório Hoechst Marion Roussel, S/A, Brazil), cystein, glycerol a všechny ostatní použité chemikálie (Lachema a.s., Česká republika). Aplikovaná antibiotika: Streptomycin 25 µg, Erythromycin 15 µg, Colistin 10 µg a Chloramphenicol 30 µg (Bio Rad, Hercules, CA, USA). BactoPepton (Difco Ltd, USA) Mac Conkey bujón, MPA agar a ostatní materiál a živné půdy (Trios® s.r.o. Česká republika).

Laboratorní vybavení a přístroje pro izolaci mikrobiologické analýzy: horkovzdušný sterilizátor Stericell® 111 (Mediset-Chironax s.r.o. Česká republika), germicidní lampa Prolux GM 30 W SPHO1 (Promos trading, s.r.o. Česká republika), roztírací mikrobiologické kličky, petriho misky, Moorovy tampony (Merci, s.r.o. Česká republika).

Odběr a izolace E. coli produkujících ESBL a rezistentních k chinolonům ve vodním prostředí: mikrobiologické vzorky byly odebírány v blízkosti čističky Modřice (Vodárny a kanalizace Brno) pomocí Moorových tamponů, vysterilizovaných při 110 °C a po dobu 24 hod exponovaných v řece Svatce. 25 g Moorova tamponu s biofilmem bylo přeneseno pomocí pinzety do 225 ml Mac Conkey bujónu. Biofilm byl dále kultivován 24 hod. při 37 °C, následovalo dvojí ředění equilibrium. Zásobní roztok (900 µl) byl kontaminován 100 µl původního roztoku obsahující kulturu (*E. coli*) a kontinuálně zředěn ($1 \cdot 10^{-3}$). 100 µl roztoku bylo za pomoci plastové kličky rozetřeno na Mac Conkey agar s kyselinou nalidixovou ($10,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a Mac Conkey agar s Cefotaximem ($2,16 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Po naočkování pomnožené kultury následovala kultivace při 37 °C po dobu 24 hod. Z pevných půd, byla provedena izolace jednotlivých kolonií na chromogenní médium (10 µl na 1 misku), odkud byly izolované kultury dále přeneseny na MPA. Naočkované misky byly invertovány a umístěny do termostatu temperovaného na 37 °C po dobu 24 hod. Isoláty byly konzervovány ve sterilním kryoprotektivním médiu a po dobu 130 dnů zamraženy v kryozkumavkách (1 ml) při -70 °C ve vertikální poloze.

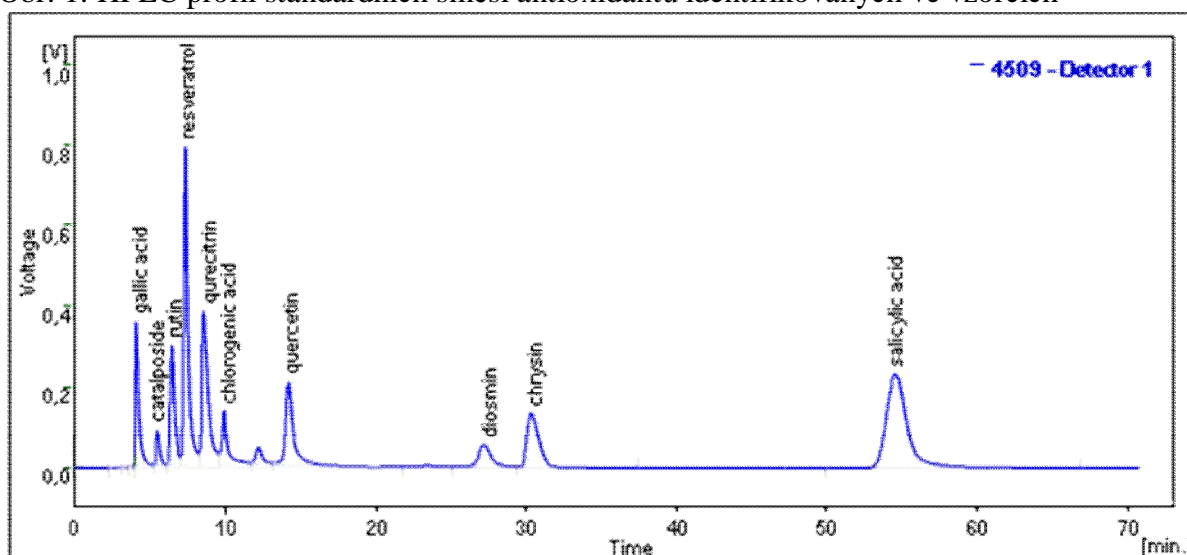
Odběr a izolace (Salmonella): vzorky byly odebrány z tkání kloaky uhynulých racků (*chroicocephalus ridibundus* L.) v oblasti Nové Mlýny (Česká republika), pomocí Moorových tamponů, vysterilizovaných při 110 °C. Isolace vzorku byla provedena pomocí normalizované metody ISO 6579. ČSN 56 0088. Pomnožení 1 g kultury probíhalo v 9 ml 1 % peptonové vodě s 0,5 % NaCl. Pro selektivní pomnožení (1:10) bylo použito tetrathionátové půdy, následovala 48 hodinová inkubace při 43 °C a seleničitanové půdy s cysteinem při 37°C po dobu 48 hod. Isoláty byly očkované na selektivní diagnostické půdy. Po naočkování pomnožené kultury, následovala kultivace při 37 °C po dobu 24 hod. Z pevných půd, byla provedena izolace jednotlivých kolonií na chromogenní médium (10 µl na 1 misku), odkud byly izolované kultury dále přeneseny na MPA. Naočkované misky byly invertovány a umístěny do termostatu temperovaného na 37 °C po dobu 24 hod. Isoláty byly konzervovány ve sterilním kryoprotektivním médiu a po dobu 130 dnů zamrazeny v kryotzkumavkách (1 ml) při -70 °C ve vertikální poloze.

Výsledky chromatografických analýz byly zpracovány statistickými funkcemi software Effi Validation ©2003, k vyhodnocení vztahů mezi výsledky antioxidačních potenciálů, a dále k vyhodnocení korelací mezi antibakteriálními efekty analytů bylo použito Pearsonovy korelace programu Microsoft Excel® sady Microsoft office® 2003.

Výsledky a diskuse

Plody některých ovocných dřevin ze skupiny méně pěstovaných ovocných druhů se vyznačují vysokým obsahem nativních antioxidantů, zejména flavonoidů a esterů fenyلكarboxylových kyselin [12]. Vzhledem k faktu, že antioxidanty se snadno účastní redoxních reakcí, vymezují se tyto látky jako velmi vhodné k elektrochemické detekci [13]. V plodech (*Lonicera edulis* Turcz. Ex Freyn) a (*Lonicera kamtschatica* L.) byly identifikovány následující antioxidanty: kyselina galová, katalposid, rutin, resveratrol, quercitrin, quercetin, diosmin, chrysin a kyselina salicylová.

Obr. 1: HPLC profil standardních směsí antioxidantů identifikovaných ve vzorcích

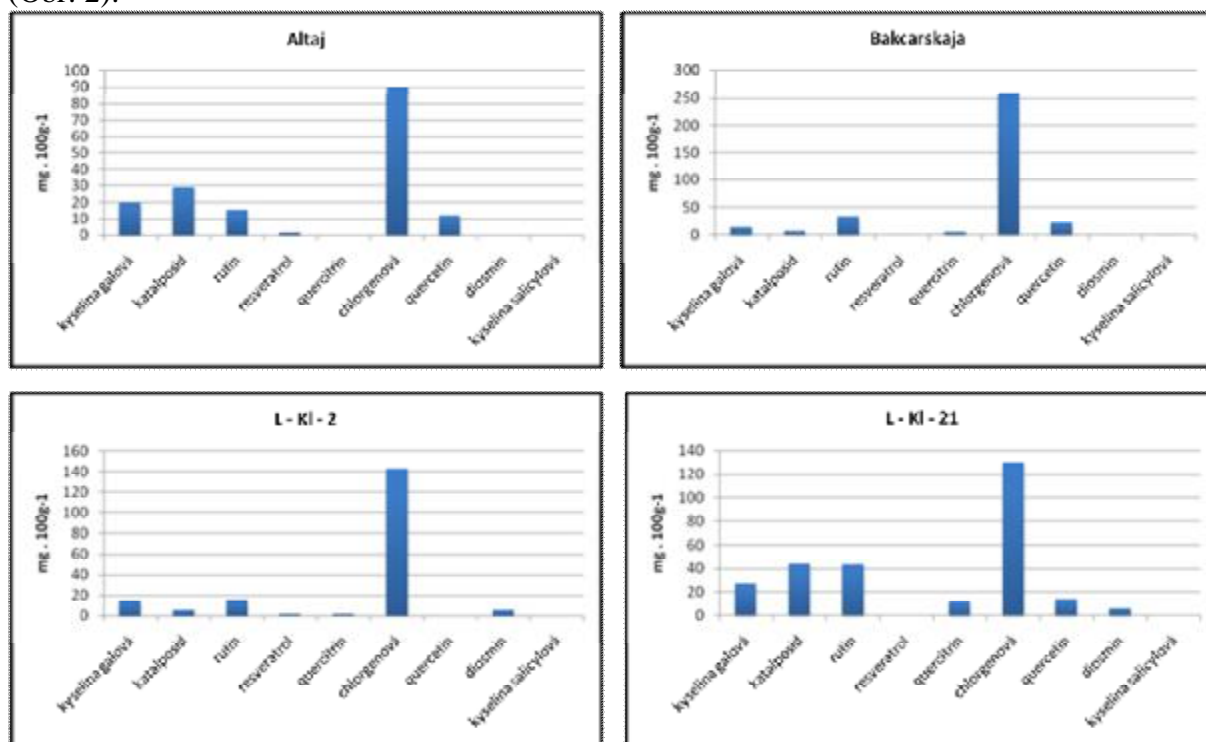


Podmínky chromatografické separace byly optimalizovány podle následujících parametrů: Objem nástřiků standardních směsí a reálných vzorků na kolonu byl nastaven na 10 µl. Vzorky byly injektovány automaticky. Průtok mobilní fáze činil 0,5 ml.min⁻¹, prostor chromatografické kolony byl termostatován na 42 °C. Poměr eluentů mobilní fáze sestával

ze 40 % kyseliny octové a 60 % methanolu (v/v). Elektrochemický detektor snímal odezvy při aplikovaném pracovním potenciálu 900 mV. Detekční limit byl stanoven 3S/N.

Je známo, že látky bez elektrochemické aktivity nevykazují ani antioxidační aktivitu, naopak u látek s nízkými půlvlnovými oxidačními potenciály je antioxidační aktivita pravděpodobná. Protože mezi antioxidační aktivitou a schopností látky snadno se elektrochemicky oxidovat, tj. poskytovat signál při elektrochemické detekci, existuje přímá souvislost, spojení selektivní a citlivé elektrochemické detekce s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC/ECD), umožňující separovat současně větší množství analyzovaných složek v jednom běhu, pak v tomto případě představuje ideální analytický nástroj k řešení problematiky [14].

Na základě lineární kalibrace byly fenolické látky zkoumaných vzorků kvantifikovány (Obr. 2).

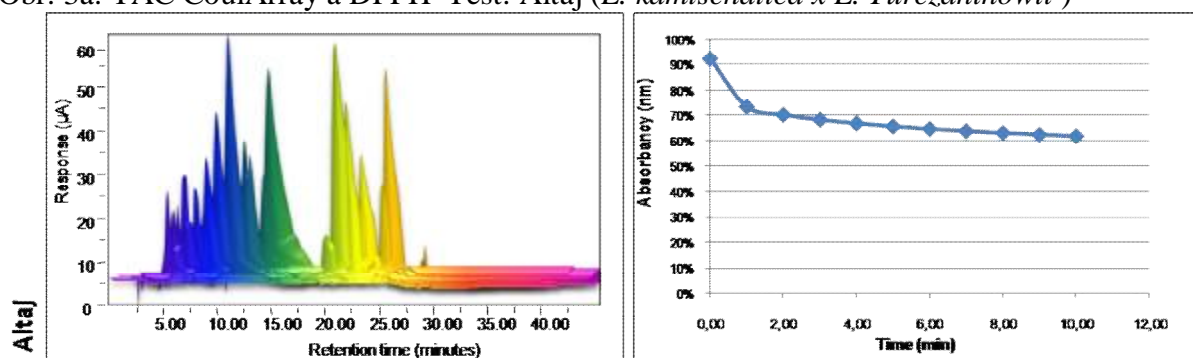


Hydroxycinematy, především kyselina neochlorogenová, spolu s kyselinou chlorogenovou, jsou v ovoci nejvíce zastoupeny v plodech zástupců rodu (*Prunus*) [15], roli dominantní fenolické komponenty sehrávají i v jablcích [16]. Na základě sestavených HPLC profilů (Obr. 2) je zřejmé, že kyselina chlorogenová, je v plodech zimolezů nejvíce zastoupeným antioxidantem. Deriváty kyseliny hydroxybenzoové jsou v ovoci zastoupeny nejvíce ve formě esterů fenolických kyselin, největší diverzitu do jejich struktur vnášejí kyseliny galová a salicylová [7]. Kyselina galová je v analyzovaných plodech nejvíce zastoupenou látkou, reprezentující tuto skupinu antioxidantů. Z antioxidantů flavonoidního skeletu, je ve všech vzorcích nejvíce zastoupen flavonol quercitrin, u odrůd Altaj, Bakcarskaja a klíčovského genotypu L- KI 21 byly nalezeny signifikantní koncentrace *trans* resveratrolu.

Protože mezi koncentrací antioxidantů zastoupených v biologických maticích a antioxidační kapacitou/aktivitou existuje prokazatelný vztah, s využitím HPLC-ED lze určit antioxidační kapacitu vztahenou k obsahu majoritně zastoupených antioxidačních komponent a současně je možné přítomné antioxidanty kvantifikovat a určit jejich podíl na TAC [8]. Antioxidační potenciál zkoumaných vzorků byl stanoven metodou TAC-CoulArray, DPPH[•] test byl aplikován jako principiálně odlišná reference [11].

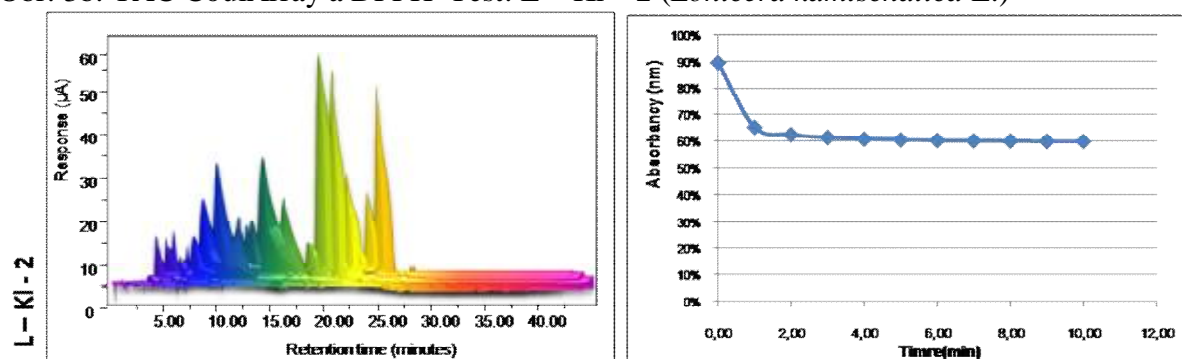
Obr. 3a, b, c, d. Objem nástřiku byl 30 μl . Mobilní fáze A sestávala z 0.2 % (v/v) kyseliny mravenčí, MF B byl acetonitril. Profil gradientu byl lineárně zvětšován od 12 na 22 % pro B (v/v) do 20 minut od startu, na 50 % B do 25 min, na 55 % do 30 min. Separace byla indukována elucí s negativním gradientem na 15% B do 45 min. Průtokový poměr činil $0,8 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$. Elektrochemický detektor snímal odezvy při aplikovaném potenciálu na pracovní elektrody -80, 0, 80, 160, 240, 320, 400, 480, 560, 640, 720 a 800 mV. Výsledné plochy píků detekovaných flavonoidů byly sumarizovány. Sečtené plochy vyjadřují celkové množství antioxidantně aktivních komponent (flavonoidů) ve vzorcích. Na základě rozdílů mezi plochami píků jednotlivých chromatogramů, byla vytvořena srovnávací řada stanovených plodů, v níž je rozdíl v obsahu antioxidantně aktivních flavonoidů stanovených plodů vyjádřen v relativních procentech a interpretován jako relativní antioxidantní kapacita.

Obr. 3a: TAC CoulArray a DPPH[•] Test: Altaj (*L. kamtschatica* x *L. Turczaninowii*)



Z chromatogramu odrůdy Altaj, je patrný vyrovnaný poměr antioxidantů s rychlou redukční kinetikou (deriváty kyseliny benzoové a hydroxycinematy) a flavonolů, vyznačujících se pomalejší redoxní interakcí. Takové rozložení antioxidantního potenciálu koresponduje hodnotou antioxidantní kapacity TAC = 100 %, na základě výsledků DPPH[•] testu byla odrůdě Altaj rovněž přiřazena hodnota 100 %. Odrůda Altaj tedy vykazovala nejvyšší antioxidantní potenciál ze všech stanovených vzorků.

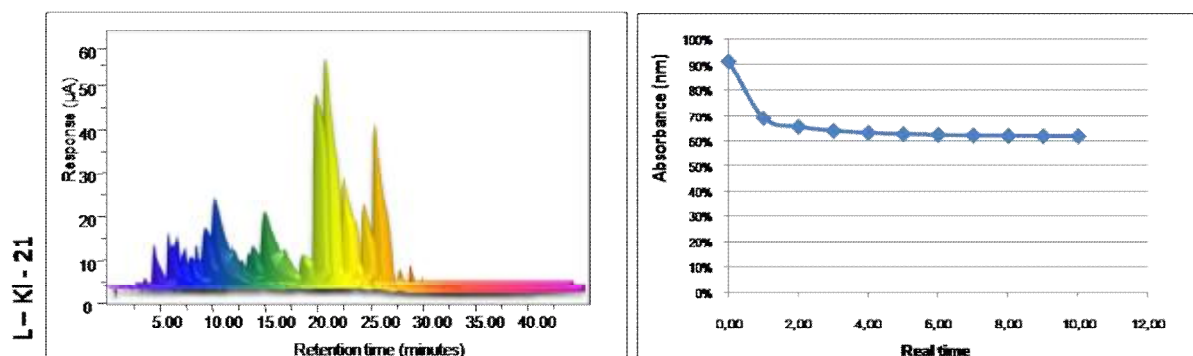
Obr. 3b: TAC CoulArray a DPPH[•] Test: L – Kl – 2 (*Lonicera kamtschatica* L.)



U genotypu L – Kl – 2 byl zjištěn pořadí druhý nevyšší antioxidantní potenciál. Evidentně vyšší koncentrace flavonoidů nad fenylylkarboxylovými kyselinami zapříčiňují pomalejší průběh oxidace vzorku na počátku retence. Relativní míra celkové antioxidantní kapacity (TAC) je 90,17 %. Výsledná hodnota antioxidantní aktivity DPPH[•] testu

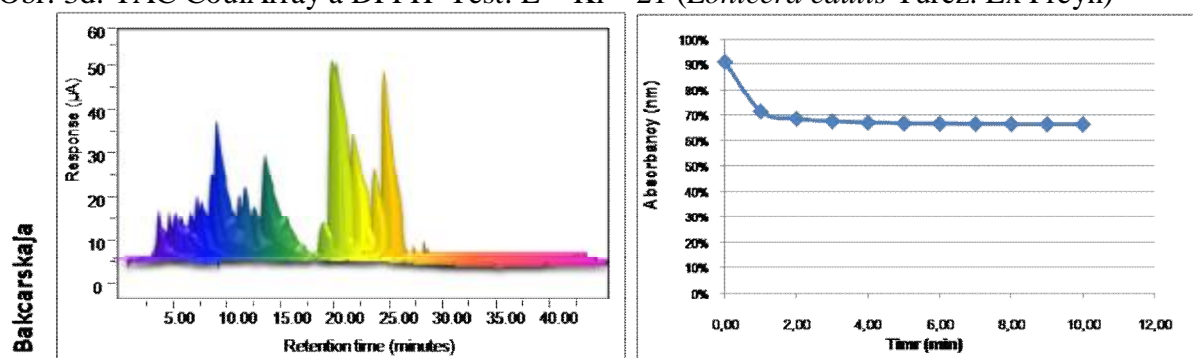
koresponduje s hodnotou odrůdy Altaj, antioxidační potenciál genotypu L – Kl – 2 je 99,71 %.

Obr. 3c: TAC CoulArray a DPPH[•] Test: L – Kl – 21 (*Lonicera kamtschatica* L.)



V řadě čtyř vzorků byla Genotypu L- Kl – 21 přiřazena po stanovení TAC přiřazena hodnota 65,28 %. Naproti tomu Gazdík et al. (2008), uvádí hodnotu TAC zjištěnou u téhož genotypu identickou metodou 38,72 %. Vysokou průkaznost difference lze vysvětlit interspecifickou diverzitou vzorků ve srovnávací řadě [8, 11], rovněž počet stanovených vzorků (5) nekorresponduje. Stanovená hodnota DPPH[•] testu je 97,85 %.

Obr. 3d: TAC CoulArray a DPPH[•] Test: L – Kl – 21 (*Lonicera edulis* Turcz. Ex Freyn)



Nejnižší antioxidační potenciál, byl i přes vysoké koncentrace flavonoidů i kyseliny chlorogenové (obr. 2), zjištěn u odrůdy Bakcarskaja. Hodnota TAC zde dosahuje 50,82 %, přičemž extrakt této odrůdy byl schopen inhibice volného radikálu DPPH[•] oproti odrůdě Altaj pouze 81,53 %.

Komplexní vypovídací schopnost 82,57 % obou metod, byla validována statisticky za pomoci Pearsonova testu. Výsledky aplikovaných metod jsou shodné z 83 %.

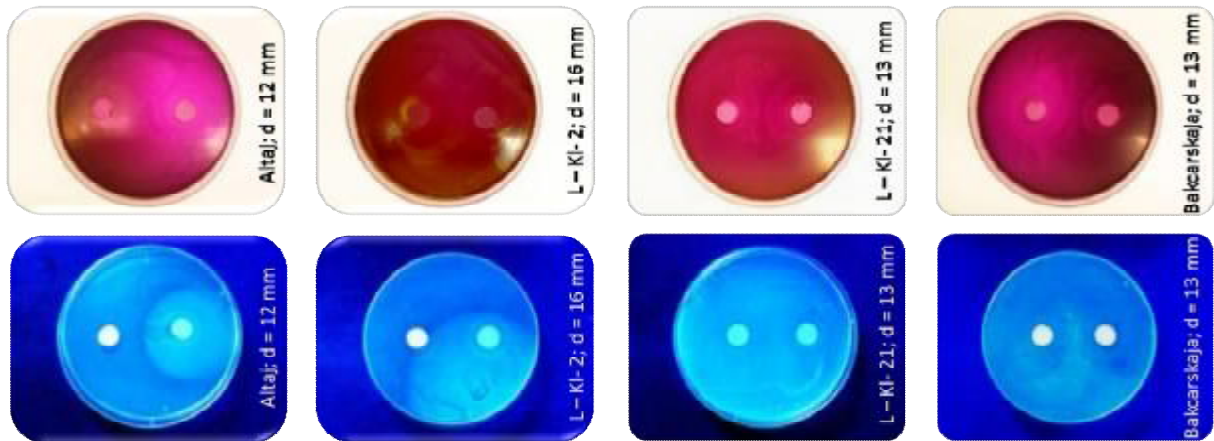
Schopnost flavonoidních látek vylučovat volné kyslíkové radikály (ROS) je dána především přítomností katecholu na B-aromatickém kruhu, 3-hydroxylovou skupinou a 2,3 dvojnou oxo-vazbou [18].

Při redoxních reakcích fenolických látek s antigenním filmem bakteriální membrány, mohou tyto látky poskytovat skeletální fragmenty (katechol), které mohou být ve sledu začleněny do antigenních struktur, přičemž významnou roli zde sehrává stupeň hydroxylace původního skeletu a přítomnost dvojně vazby na oxo-skupinu. Proteiny vázající aromatický fragment vytváří s antibiotikem stálé komplexy a sami přestávají být aktivní. Přerušení transpeptidace peptidoglykanu způsobí inhibici syntézy buněčné stěny. V důsledku takové

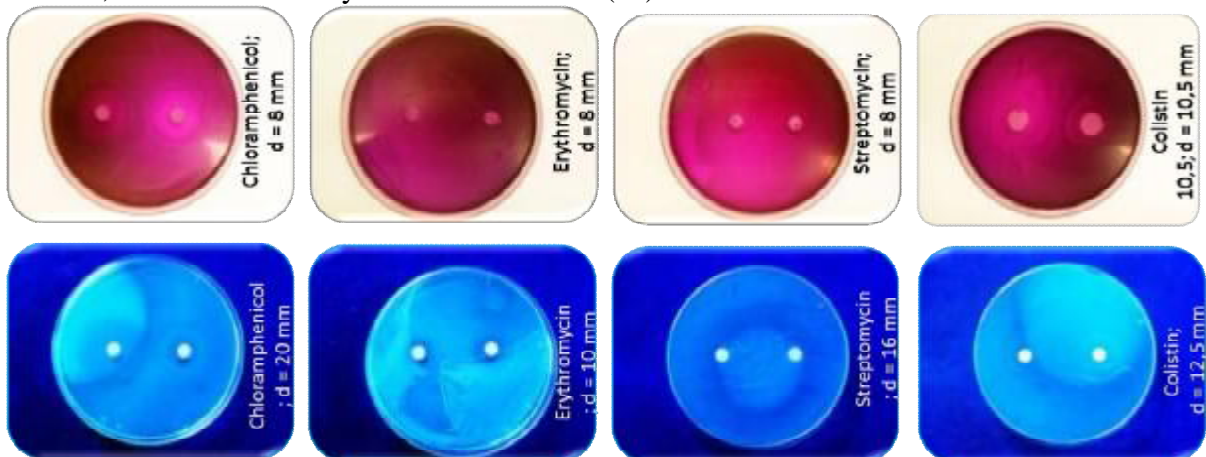
interakce, může u některých serotypů dojít k syntéze specifických enzymatických komplexů, vlivem jejichž zvýšené koncentrace dochází k autolýze bakteriální matrice [19].

Pro zjištění schopnosti zkoumaných genotypů inaktivovat klinické izoláty multirezistentní (*E. coli*) a vysoce patogenního serotypu (*Salmonella enterica*) byl za použití difuzní diskové metody sestaven bateriový test (obr. 4-6).

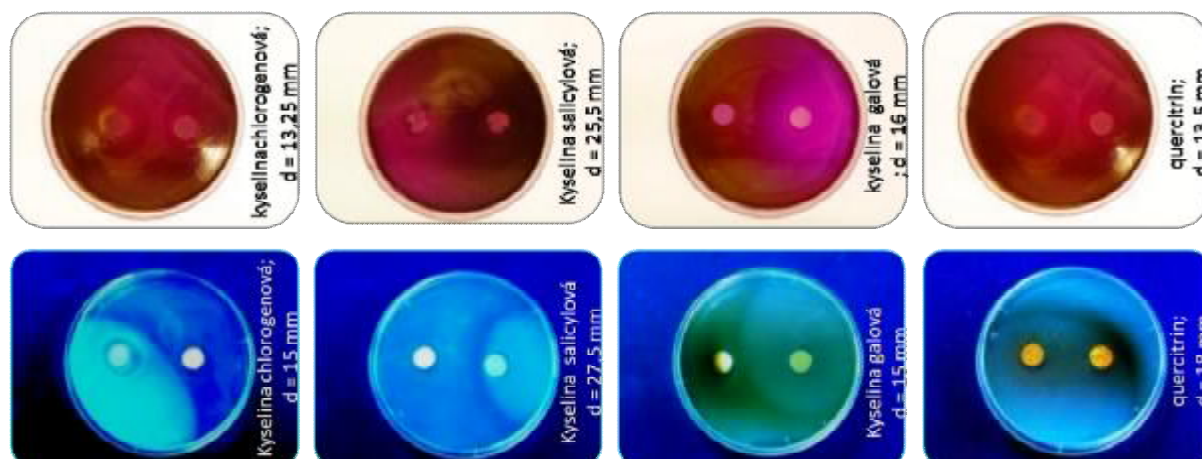
Obr. 4a, b: Difuzní diskový test: míra inhibice (4a) extraktů plodů vůči patotypu (*Salmonella enterica*) a (4b) a multirezistentní (*E. coli*).



Obr. 5a, b: Difuzní diskový test: míra inhibice (5a) konvenčními



Obr. 6a,b: Difuzní diskový test: míra inhibice (6a) fenolickými antioxidanty



Pro stanovení antimikrobiální aktivity zkoumaných extraktů vůči klinickým isolátům multirezistentních patotypů (*Escherichia coli*), (*Salmonella*) a pro porovnání s referencí bylo využito difuzní diskové metody, na jejíž bázi byl sestaven bateriový test zahrnující čtyři ovocné extrakty a adekvátní počet majoritních antioxidantů spolu se čtyřmi antibiotiky se středním a širokým účinností spektrem (Streptomycin, Erythromycin, Chloramphenicol, Colistin). Na základě zjištěných inhibičních zón byly charakterizovány antibakteriální účinky ovocných extraktů a majoritních antioxidantů identifikovaných v plodech. V případě klinického isolátu (*E. coli*), byla zjištěna neúčinnost všech testovaných antibiotik. Středně silný inhibiční efekt vykázal Streptomycin, vysoká inhibice byla zjištěna pouze u Chloramphenicolu. Naopak střední až výraznou míru inhibice vykázala všechna testovaná nutraceutika. Ze zkoumaných plodů, na růst kolonií obou patogenů nejintenzivněji působil extrakt genotypu L – Kl – 2. Přestože byla zjištěna pozitivní korelace mezi antioxidační kapacitou a antioxidační aktivita stanovených vzorků, hodnoty antioxidačních potenciálů a antimikrobiální aktivity navzájem nekorrespondují. Je průkazné, že na antimikrobiálním efektu stanovených extraktů se podílejí látky bez redoxní povahy. Mezi schopnostmi zkoumaných extraktů inhibovat růst obou Gram negativních bakterií byla nalezena pozitivní lineární korelace, $r = 0,98$.

Závěr

Vyhodnocení dieteticko – terapeutických profilů a preklinické zkoumání antimikrobiálních aktivit extraktů plodů (*Lonicera kamtschatica* L.), (*Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn) a jejich interspecifických hybridů potvrzuje, že zkoumané odrůdy mohou být plně akceptovány jako funkční potraviny. Předložená studie dokládá aktuální potřebu přehodnocení možností využití přírodních produktů jako prevence namísto suplementace ovoce a zeleniny syntetickými a semisyntetickými doplňky stravy.

Poděkování:

Studie byla podpořena projektem MSM 6215712402.

Reference:

- [1] Tauxe RV., Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge *Emerg Infect Dis.* 1997 Oct-Dec;3(4):425-34.

- [2] Lindsay, AJ., Chronic Sequelae of Foodborne Diseases, *Emerg Infect Dis. Special Issue*, 1997 Oct-Dec;3(4):425-34.
- [3] WHO, The World Health Report 2008. In: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Available on-line: http://www.who.int/whr/2008/whr08_en.pdf
- [4] FAO/WHO/OIE. Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials. Report of a meeting held in FAO, Rome, Italy, 26–30 November 2007. FAO, Rome, Italy, and WHO, Geneva, Switzerland.
- [5] Abraham, EP., Chain, E. 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 3713:837. In *Microbiology: A Centenary Perspective*, edited by Wolfgang K. Joklik, ASM Press. 1999
- [6] Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*. 1983; 308:681–5.
- [7] Šrámová, H., Beneš Č. Salmonelózy v České republice v letech 1989 – 1998. *Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* 2000, vol. 49, No.1, p. 34 – 38.
- [8] Gazdík, Z., Řezníček, V., Adam, V., Zítka, O., Krška, B., Matuskovic, J., Plšek, J., Saloun, J., Horna, A., Kizek, R. Utilizing of liquid chromatography with electrochemical detection for determination of antioxidants in less common. *Molecules*. 2008. sv. 13, č. 11, s. 2823-2836. ISSN 1420-3049.
- [9] Wild C, Fasel J. Effect of a flavonoid on the capillary resistance of the rectal mucosa in hepatic cirrhosis. *Am J Proct* 1969;20:60-2.
- [10] Beklová, M., Zítka, O., Gazdík, Z., Adam, V., Hodek, P., Stiborová, M., Horna, A., Kizek, R., Electroanalytical techniques for determination of flavonoids. *Toxicology Letters*. 2008. sv. 180, č. 1, s. 230. ISSN 0378-4274.
- [11] Gazdík, Z., Řezníček, V., Plšek, J., Saloun, J., Krška, B., Stejskal, K., Adam, V., Diopan, V., Kizek, R. Comparing of antioxidant capacity rates evaluated in samples of less common fruit species. In *XIII. International Conference Electrochemical Quality Test*. 2008, s. 107-120.
- [11] Gazdík, Z., Krška, B., Adam, V., Saloun, J., Řezníček, V., Horna, A., Kizek, R. Electrochemical determination of antioxidant potential of less common fruit species. *Sensors*. 2008. sv. 8, č. 11, s. 7564-7570. ISSN 1424-8220.
- [12] KOCHHAR S., P., ROSSELL J., B., 1980, *Detection, Estimation. and Evaluation of Antioxidants in Food Systems*, In: *Food Antioxidants*, Elsevier, 19-64, London 1990, Forn Pujol M., *Circ. Farm.* 38, 113, 1990
- [13] Long, H., Zhu, Y., Coury, LA., Duda, CT., Kissinger, CB., Kissinger, PT., *LC/GC Europe*. 2001. 14, 323-328.

- [14] Jirovský, D., 2007, Vysokoučinné separační techniky v analýze fyziologicky významných látek, Habilitační práce, s. 14, 15, PFUP, Katedra analytické chemie, Olomouc 2007
- [15] Donovan, J.L.- Meyer, A.S.- Waterhouse, A.L. Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Prunes and Prune Juice (*Prunus domestica*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 46, Issue 4, April 1998, Pages 1247-1252
- [16] Guyot, S.N. Marnet, D.- Laraba, P., Sanoner, J.- Drilleau, J. *Agric. Food Chem.* 46 (1998) 1698 – 1705
- [17] Belitz, H.D. Grosch, W. *Food chemistry*, 2. edition, Springer Verlag, 1999, 992 p., ISBN 3 – 540-64704 – X
- [18] Benavente-Garcã O., Castillo, J., Lorente J., Ortuno, A., Del, Rio JA. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry* 68 (2000) 457-462
- [19] Ferrari, M. J., Turnidge, J. D. Section V. Antibacterial agents and susceptibility test methods, 1037-1196. In: *Manual of clinical microbiology Vol. 1*. Editor Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M. A., Tenover, R. H., ASM Press Washington, DC., 2003, 1212 p.

Abstrakt

Infekční onemocnění způsobená mikrobiálními kontaminanty potravin představují pro lidskou populaci aktuální zdravotní i sociálně-ekonomická rizika. Mezi epidemiologicky významná onemocnění gastrointestinálního traktu patří alimentární infekce vyskytující se v různých klinických formách a otravy bakteriálními endotoxiny (enterotoxikózy a toxoinfekce). Bakterie a jejich metabolity pronikající do potravního řetězce mohou být nejen přímou příčinou řady onemocnění, ale současně i nositeli determinant rezistence k antimikrobiálním látkám. Výsledky epidemiologických studií WHO a FAO potvrzují fakt, že zvýšený výskyt kmenů s atypickými mechanismy rezistencí je fenoménem, determinujícím vzrůstající počty pacientů v oblasti gastrointestinálních onemocnění přenášených alimentární cestou. Řada klinických i experimentálních pracovišť věnuje v současnosti značnou pozornost studiu patofyziologických mechanismů vlivem expozice organismu mikrobiálním patogenům, jejichž degenerativní působení dokazují mnohé histologické a imunologické studie, přičemž jsou vyvíjeny terapeutické strategie, zahrnující nové možnosti medikace a prevence. Cílem studie bylo hodnocení a preklinické testování biologicky aktivních látek schopných zhášení ROS, obsažených v extraktech plodů (*Lonicera kamtschatica* L.), (*Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn) a jejich interspecifických hybridů, ve vztahu k antimikrobiální aktivitě. Parciální cíle studie byly vztaženy k výzkumu strukturních aspektů zkoumaných nutraceutik (fenyلكarboxylových kyselin a polycyklických hydroxylovaných uhlovodíků s nízkou molekulovou hmotností). Ke stanovení HPLC profilu jednotlivých genotypů bylo využito vysokoučinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED). Vzhledem k faktu, že se antioxidanty jeví jako látky vhodné k elektrochemické detekci, antioxidační kapacita byla zjištěna pomocí TAC – CoulArray, metody založené na principu HPLC s coulometrickou detekcí. Ke zjištění antioxidační aktivity byl využit DPPH test. Pro stanovení antimikrobiální aktivity zkoumaných extraktů vůči klinickým isolátům

multirezistentních patotypů (*Escherichia coli*), (*Salmonella*) a pro porovnání s referencí bylo využito difusní diskové metody, na jejíž bázi byl sestaven bateriový test zahrnující čtyři ovocné extrakty a adekvátní počet majoritních antioxidantů spolu se čtyřmi antibiotiky se středním a širokým spektrem účinnosti. Na základě dosažených výsledků byly identifikovány a kvantifikovány klinicky významné antioxidanty (neuroprotektivní kyseliny: galová, 4-aminobenzoová, chlorogenová, inhibitory CYP2C9 a CYP3A4: flavonol quercetin a jeho glykosidy, iridoidní glykosid katalposid a stilben resveratrol, jejichž nejvyšší koncentrace zjištěné u odrůd Altaj, L-Kl - 2 a L-Kl - 21 korespondovaly s nejvyšším antioxidačním potenciálem uvedených genotypů. Extrakty klčovských genotypů vykázaly rovněž vysokou antimikrobiální aktivitu, naproti tomu antibiotika Colistin, Ampicilin, Streptomycin a Chloramphenicol při pokusu inhibovat *in-vitro* kultury (*E. coli*) selhala. Vztahy mezi hydroxylovými skupinami flavonoidních, benzoátových a hydroxycinemátových skeletů jsou diskutovány. Antibakteriální účinky čtyř zkoumaných extraktů (*Lonicera* sp.) vykázaly signifikantní antibakteriální účinnost. Všechny zkoumané genotypy jsou významnými zdroji nízkomolekulárních antioxidantů. Studie potvrzuje, že plody (*Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn), (*Lonicera kamtschatica* L.) a jejich hybridní genotypy mohou být akceptovány jako funkční potraviny.

Klíčová slova: *Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn, *Lonicera Kamtschatica* L., HPLC-ED, TAC - CoulArray, DPPH test, *E. coli*, *Salmonella*