Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

KATEDRA FARMAKOGNOZIE

D I P L O M O V Á P R Á C E

Screening antiradikálové aktivity drog s obsahem polyfenolů

2007

Petr Vyhnálek

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a použil jen uvedenou literaturu.

Za odborné vedení, ochotu, péči a cennou pomoc při vypracování této diplomové práce děkuji Doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. Dále děkuji za technickou pomoc při

zpracovávání práce Mgr. Petru Červenému a Mgr. Josefu Malému z Katedry sociální a klinické farmacie.

OBSAH

1. ÚVOD……..8
2. CÍL PRÁCE ……10
3. TŘÍSLOVINY ……11
3.1. Obecná charakteristika tříslovin ……11
3.2. Klasifikace tříslovin ……12
3.2.1. Hydrolyzovatelné třísloviny ……12
3.2.1.1. Struktura hydrolyzovatelných tříslovin ……..13
3.2.1.2. Monomerní hydrolyzovatelné třísloviny ……13
3.2.1.3. Oligomerní hydrolyzovatelné třísloviny ……15
3.2.2. Kondenzované třísloviny (proanthocyanidiny) ……16
3.2.2.1. Struktura kondenzovaných tříslovin ……...17
3.2.2.2. Proanthocyanidiny typu B ……..18
3.2.2.3. Proanthocyanidiny typu A ……..19
3.2.2.4. Oligomery ……...19
3.2.2.5. Polymery…….....19
3.3. Fyzikálně chemické vlastnosti, extrakce, důkaz, stanovení ……20
3.3.1. Vlastnosti ……...20
3.3.2. Extrakce ……21
3.3.3. Důkaz ……21
3.3.4. Stanovení ……...22
3.3.4.1. Stanovení založená na precipitaci proteinů ……..22
3.3.4.2. Stanovení kondenzovaných tříslovin ……22
3.3.4.3. Stanovení hydrolyzovatelných tříslovin ……...23
3.3.4.4. Stanovení celkových fenolů ……..23
3.4. Biologické vlastnosti tříslovin ……23
3.4.1. Terapeutické účinky založené na adstringentním působení ……..24
3.4.2. Antioxidační účinek ……...25
3.4.3. Enzymatická inhibice ……25
3.4.4. Ostatní účinky ……...26
4. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK *IN VITRO*…….27
4.1. Metody založené na eliminaci radikálů ……27

4.1.1. Metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů …….27
4.1.1.1. Metoda používající ABTS (metoda TEAC) ……..27
4.1.1.2. Metoda používající DPPH …….28
4.1.1.3. Metoda používající galvinoxyl ……..29
4.1.1.4. Využití jiných stabilních radikálů ……29
4.1.2. Metody hodnotící eliminaci kyslíkatých radikálů ……29
4.1.2.1. Metoda ORAC ……...29
4.1.2.2. Metody založené na vychytávání OH-radikálů ……30
4.1.2.3. Metody založené na vychytávání superoxidového anion-radikálu ……...30
4.1.2.4. Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace ……..30
4.2. Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek ……..31
4.2.1. Metody chemické …….....32
4.2.1.1. Metoda FRAP (ferric reducting antioxidant potential) ……32
4.2.2. Metody elektrochemické ……32
4.2.2.1. Cyklická voltametrie ……32
4.2.2.2. HPLC metoda s elektrochemickou detekcí ……...33
5. AGRIMONIAE HERBA – ŘEPÍKOVÁ NAŤ ……34
5.1. Matečná rostlina – název, zařazení ……..34
5.2. *Agrimonia eupatoria L.* – řepík lékařský ……34
5.3. Obsahové látky ……35
5.3.1. Flavonoidy ……..35
5.3.2. Třísloviny ……...35
5.3.3. Další látky ……..36
5.4. Použití drogy ……36
6. POUŽITÉ STANDARDY A JEJICH STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA……37
6.1. Pyrogalol……...37
6.2. Kyselina gallová ……..37
6.3. Tannin ……37
6.4. Katechin ……..37
6.5. Epigallokatechingallát ……37
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ……...38
7.1. Použité přístroje ……...38
7.2. Použité chemikálie ……...38

7.3 Důkaz flavonoidů.....39
7.4. Stanovení tříslovin.....39
7.5. Stanovení flavonoidů.....40
7.6. Měření antiradikálové aktivity 41
7.6.1. Antiradikálová aktivita methanolového extraktu drogy připraveného za tepla.....42
7.6.2. Antiradikálová aktivita methanolového extraktu drogy připraveného za studena 42
7.6.3. Antiradikálová aktivita methanolového extraktu drogy připraveného za tepla po odstranění chlorofylu 43
7.6.4. Antiradikálová aktivita lyofilizovaného vodného výluhu drogy 43
7.6.5. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku kyseliny gallové 43
7.6.6. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku pyrogalolu 44
7.6.7. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku tanninu 44
7.6.8. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku epigallokatechingallátu 44
7.6.9. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku katechinu 45
8. VÝSLEDKY 46
8.1. Důkaz flavonoidů.....46
8.2. Stanovení tříslovin 46
8.3. Stanovení flavonoidů.....46
8.4. Měření antiradikálové aktivity 47
8.4.1. Antiradikálová aktivita methanolového extraktu drogy připraveného za tepla 47
8.4.2. Antiradikálová aktivita methanolového extraktu drogy připraveného za studena 48
8.4.3. Antiradikálová aktivita methanolového extraktu drogy připraveného za tepla po odstranění chlorofylu 49
8.4.4. Antiradikálová aktivita lyofilizovaného vodného výluhu drogy 50
8.4.5. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku kyseliny gallové 51
8.4.6. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku pyrogalolu 52
8.4.7. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku tanninu 53
8.4.8. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku epigallokatechingallátu 54
8.4.9. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku katechinu 55
9. DISKUSE.....56

10. ZÁVĚR……59
11. LITERATURA ……...60

1. ÚVOD

V posledních letech se zvyšuje množství poznatků a úroveň znalostí o úloze volných radikálů při oxidačním stresu u živých organismů. Volným radikálům vznikajícím *in vivo* a majícím řadu fyziologických funkcí (např. účast v protizánětlivých reakcích, v procesu fagocytózy), je věnována v současnosti veliká pozornost a sleduje se jejich negativní působení na organismus při řadě onemocnění. Především jde o reaktivní kyslíkové radikály (ROS – reactive oxygen species) a dusíkové radikály (RNS – reactive nitrogen species). Tyto radikály působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci. Kaskáda reakcí iniciovaná radikály vede k následným změnám ve struktuře buněk, k poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí v organismu. Reparativní procesy v organismu nemohou samy plně eliminovat poškození biomolekul, významnou roli při ochraně před volnými radikály hraje prevence.

Jednou z možností ochrany organismu před působením exogenních i endogenních volných radikálů je působení antioxidantů. Dle již klasické definice jsou antioxidanty molekuly, které – jsou-li přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami , jež by měly chránit – mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci těchto látek.

Kromě endogenních nízkomolekulárních antioxidantů, jako je glutathion, kyselina močová, koenzym Q a další, se v posledních letech do středu pozornosti dostávají také mnohé látky přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají s potravou. Některé potraviny rostlinného původu mají tak vedle své nutriční a energetické hodnoty důležitou roli jako zdroj antioxidantů. K přírodním látkám s antioxidační aktivitou jsou tradičně řazeny antioxidační vitaminy C a E a karotenoidy. Velký význam se však v poslední době přikládá dalším látkám, zejména polyfenolickým sloučeninám. Sem patří například flavonoidy, katechiny, fenolické kyseliny. Zdrojem těchto látek jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaje, vína, aromatické a léčivé rostliny. Celkový denní příjem polyfenolů z různých zdrojů byl odhadnut na 1 g a je tedy vyšší než příjem antioxidačních vitaminů. V řadě experimentálních studií bylo prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidačních vitaminů. Klinické a epidemiologické studie rovněž prokazují korelaci mezi antioxidační aktivitou látek přijímaných v potravě a prevencí některých onemocnění, např. kardiovaskulárních chorob, karcinogeneze, neurologických poruch či procesu stárnutí.

Z uvedených důvodů roste zájem stanovit antioxidační aktivitu různých látek rostlinného původu. Jeden z přístupů ve výzkumu přírodních antioxidantů je testování reaktivity individuálních izolovaných látek vůči jednotlivým volným radikálům. Slouží především k odvození vztahů mezi strukturou a reaktivitou příslušných sloučenin. Většinu přírodních antioxidantů však přijímáme jako součást složitých směsí, jejichž složky mohou reagovat s různými radikály různými mechanismy, mohou též na sebe vzájemně působit (synergicky i inhibičně). Proto je též snaha charakterizovat antioxidační aktivitu směsných vzorků i jako celku. Kapitola uvádí přehled nejčastěji citovaných postupů, které se používají pro testování antioxidační aktivity přírodních látek a lze je rovněž použít pro charakterizaci chování směsných vzorků (rostlinných extraktů, potravin).

Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita (total antioxidant activity – TAA). TAA je parametrem, kvantifikujícím kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály. Z mnoha popsaných metod mají při stanovení TAA nejčastější použití níže zmíněné metody TEAC, FRAP a ORAC. Pojem celková antioxidační kapacita je však mnohdy používán v širším významu a rozmanitost používaných metod při jejím stanovení je značná.

Je třeba ještě připomenout, že řada látek přijímaných v rostlinném materiálu podléhá v organismu metabolickým změnám již v trávicím traktu a jejich účinek v organismu je dále ovlivněn mírou resorpce a dalším metabolismem. Proto výrazná antioxidační aktivita zjištěná *in vitro* nemusí znamenat adekvátně významný účinek *in vivo*. O metabolických procesech v trávicím traktu, biodostupnosti a farmakokinetice třís lovin nejrůznějšího charakteru je zatím známo jen velmi málo. (7)

2. CÍL PRÁCE

Vypracovat literární přehled o antioxidační a antiradikálové aktivitě tříslovin a tříslovinných drog, dále připravit extrakty z drogy *Agrimoniae herba*, optimalizovat postup extrakce, stanovit obsah fenolických látek.

Stanovit antiradikálovou aktivitu extraktů, zhodnotit výsledky.

3. TŘÍSLOVINY

3.1. Obecná charakteristika tříslovin

Historicky je význam drog obsahujících třísloviny spojen s jejich vyčiňovacími vlastnostmi, tj. s jejich schopností přeměňovat čerstvé kůže na usně. Principem je tvorba vazeb mezi kolagenovými vlákny v usni, které způsobují odolnost vůči vodě, teplotě a odírání. Tato schopnost tříslovin slučovat se s makromolekulárními látkami vysvětluje, proč precipitují celulózu, pektiny a proteiny. Vysvětluje též jejich charakteristickou svíravou a trpkou chuť – při precipitaci glykoproteinů obsažených ve slinách způsobují třísloviny ztrátu jejich zvlhčovací schopnosti.

Vazba tříslovin na makromolekuly je uskutečňována vodíkovými můstky a jinými interakcemi mezi fenolickými skupinami tříslovin a polymery. Ostatní typy vazeb (ireverzibilní interakce) jsou nutné k zajištění stability sloučenin tříslovin a kolagenových struktur. Patří sem kovalentní vazby vzniklé po oxidaci fenolů na chinony. Tvorba těchto vazeb je nezbytně podmíněna molekulovou hmotností tříslovin, která musí být ve vymezeném rozmezí. Je-li vyšší, molekula se nemůže včlenit do interfibrilárních prostorů makromolekuly; je-li nižší, molekula se může začlenit, nemůže však vytvořit dostatek vazeb ke stabilizaci celé struktury.

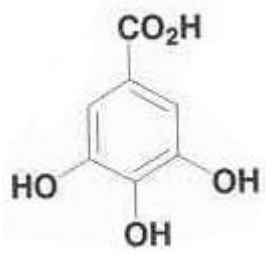
Tyto vlastnosti jsou základem klasické definice, která charakterizuje třísloviny jako „ve vodě rozpustné fenolické sloučeniny o molekulové hmotnosti 500 až 3000, které kromě klasických reakcí charakteristických pro fenoly mohou precipitovat alkaloidy, želatinu a proteiny“. Tato definice, byť stále platná, ztrácí však již na významu, když byla odhalena přesná struktura komplexu polyfenolů jako proanthocyanidinů a galloylpolyesterů. Mole a Waterman v roce 1987 definovali třísloviny jako „fenolické přírodní látky srážející proteiny z vodných roztoků“. (1)

3.2. Klasifikace tříslovin

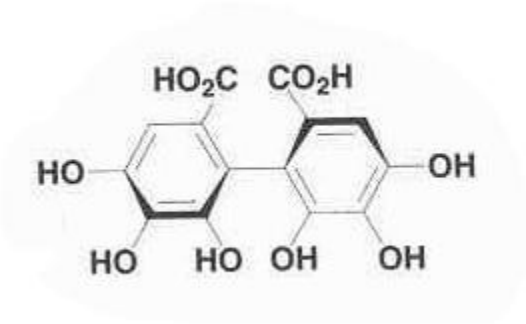
U vyšších rostlin jsou rozlišovány dvě skupiny tříslovin lišící se strukturou a biogenetickým původem: hydrolyzovatelné třísloviny a kondenzované třísloviny. (1)

3.2.1. Hydrolyzovatelné třísloviny

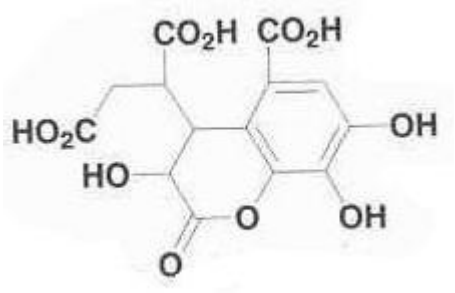
Jde o estery cukrů (či příbuzných polyolů) s různým počtem molekul fenolických kyselin. Cukrem je většinou glukóza. Fenolickou kyselinou je buď kyselina gallová v případě gallotaninů nebo hexahydroxydifenová kyselina (HHDP) a její oxidované deriváty (kyselina dehydrohexahydroxydifenová DHHDP; kyselina chebulová) u třísloviny označovaných jako ellagotanniny. Od roku 1985 bylo izolováno několik zástupců nové kategorie třísloviny. Tyto „komplexní" třísloviny jsou modifikované ellagotanniny vznikající navázáním derivátu fenylchromanu na molekulu esteru HHDP a glukózy. Jde o látky: flavano-ellagotannin, procyanidino-ellagotannin nebo flavono-ellagotannin. Gallotanniny, ellagotanniny a dehydroellagotanniny (jednoduché nebo komplexní) jsou charakteristické pro krytosemenné dvouděložné rostliny (zvl. podtřídy *Rosidae, Dileniidae, Hamamelidae).*



Obr. 1: Kyselina gallová



Obr. 2: Kyselina hexahydroxydifenová



Obr.3: Kyselina chebulová

3.2.1.1.Struktura hydrolyzovatelných tříslovin

Obecně jsou gallotanniny estery kyseliny gallové a glukózy. Mono- a digalloylestery glukózy nemají klasické vlastnosti tříslovin, protože mají příliš nízkou molekulovou hmotnost. Tyto vlastnosti, zvláště schopnost precipitovat proteiny, platí pouze pro triestery a jejich vyšší homology.

Biogeneticky vzniká kyselina gallová (3,4,5-trihydroxybenzoová) v metabolismu kyseliny šikimové. Obecně je tvořena přímou dehydrogenací kyseliny 3-dehydrošikimové nebo v některých případech oxidací kyseliny protokatechové (odvozené od kyseliny kávové). Ke glukosylaci je použita uridinfosfátglukóza (UDP-glukóza). Na základě experimentů *in vitro* se předpokládá, že vznikající monogalloylglukózové jednotky mohou fungovat jako donory nebo akceptory glukózy, což vede k 1,6-di-O-galloyl-β-D-glukóze (tj. diesteru), a tyto kroky se opakují přes 1,2,6-tri-O- a 1,2,3,6-tetra-O-galloylderiváty, až je vytvořena pentagalloylglukóza. (1)

3.2.1.2.Monomerní hydrolyzovatelné třísloviny

Výše uvedený pentaester (1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glukóza) je nejběžnější třísloviná. Hraje klíčovou roli v metabolismu tříslovin, protože většina rostlin ji dokáže metabolizovat jednou z touto cest:

1. Vývoj směrem k větším molekulám (od hexa- k undekagalloylglukóze) tvorbou bočních řetězců na C_3, C_4, C_6 nebo jejich kombinací sestávající z několika molekul kyseliny gallové vázaných meta- nebo para-depsidickými vazbami (obě formy jsou v roztoku díky migraci acylu v rovnováze). Tyto gallotanniny jsou charakteristické pro malou skupinu čeledí (*Anacardiaceae, Fagaceae, Ericaceae, Geraniaceae a Asteraceae*).

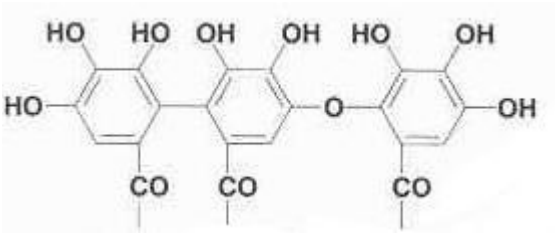
2. a) Tvorba ellagotanninů. C2-C2´ oxidativní spojování galloylových jednotek molekuly poskytuje dikarboxylhexahydroxydifenylovou část. Pentasubstituce glukózy umožňuje různé spojování mezi zbytky kyseliny gallové v polohách 1,2 nebo 1,3 za vytvoření esterů kyseliny hexahydroxydifenylové, molekula může být mono- nebo bis-HHDP ester s ostatními hydroxylovými skupinami na glukózové jednotce volnými nebo esterifikovanými kyselinou gallovou nebo dehydrogallovou.

Různé ellagotanniny obsahují ve své struktuře trigallovou sekvenci jako valoneoyl- (viz obr.4), macaranoyl- (viz obr.5) nebo tergalloyl- (viz obr.6) vznikající etherifikací molekul HHDP kyselinou gallovou (např. rugosiny A a B). Tento typ posloupnosti může

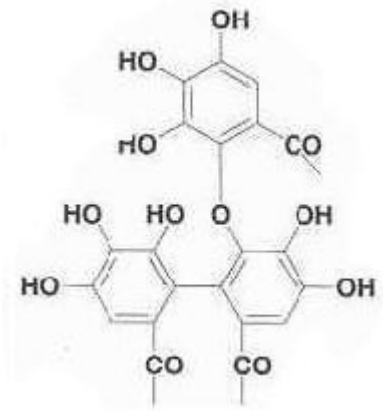
vést k depsidonu (např. praecoxin D) nebo dilaktonu (např. tirucallin A). Nejčastější oxidativní slučování zahrnuje vazbu zbytku kyseliny gallové na C_2-C_3 a na C_4-C_6 molekuly glukózy v $^4C_1$ konformaci. HHDP se může vyskytovat jako R nebo S.

b) Následovně může pokračovat metabolismus těchto HHDP esterů dále oxidací HHDP na DHHDP (homology kyseliny dehydrohexahydroxydifenylové, charakteristické pro dehydroellagotanniny, např. geraniin), nebo otevřením a přeskupním DHHDP cyklů (na homology kyseliny chebulové). Oxidativní slučování často zahrnuje zbytky kyseliny gallové na C_2-C_4 nebo C_3-C_6 glukózových jednotek v na méně výhodné $^1C_4$ konfiguraci.

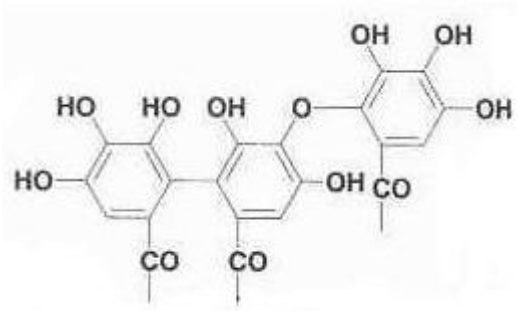
V některých případech se glukózový pyranový kruh otevírá a umožňuje reagovat volné aldehydické skupině s aromatickým jádrem zbytků kyseliny gallové. Tak vzniká například castalagin, vescalagin, casuarinin a další látky vyskytující se v zástupcích čeledí *Fagaceae, Myrtaceae, Rosaceae* a *Lythraceae.* Někdy dochází ke kondenzaci tohoto typu molekuly (přes její C_1) s C_8 nebo C_6 flavanu nebo flavonu, která vede ke komplexním třísloviná zmíněným výše (obvyklé v čeledích *Fagaceae, Combretaceae, Myrtaceae*; například camelliaannin A). (1)



Obr. 4: Valoneoyl-



Obr.5: Macaranoyl-



Obr.6: Tergalloyl-

3.2.1.3. Oligomerní hydrolyzovatelné třísloviny

Intermolekulární oxidativní slučování (C-C nebo C-O-C) vysvětluje existenci širokého počtu oligomerních ellagotanninů o molekulové hmotnosti mezi 2000 až 5000. Například rugosin D, izolovaný z druhu *Filipendula ulmaria* a dalších druhů z čeledi *Rosaceae*, má molekulovou hmotnost 1874 a je to „dimer" tellimagrandinu II nebo 1,2,3-trigalloyl-4,6-hexahydroxydifenyl-β-D-glukózy.

Výskyt oligomerních typů hydrolyzovatelných tříslovin je zřejmě omezen na dvouděložné rostliny. Jako první byl popsán v roce 1982 agrimoniin a následně bylo objeveno množství dalších látek, asi 85% dimerů a 10% trimetrů. Vzhledem ke strukturální rozmanitosti bylo navrženo klasifikovat je do pěti následujících skupin:

1. Skupina GOG (nebo GOGOG). Vazebná jednotka je složena ze dvou nebo tří zbytků kyseliny gallové (G) vázaných etherovou vazbou obsahující hydroxylovou skupinu meta- (m-GOG, tj. dehydrodigalloyl) nebo para- (p-GOG, tj. isodehydrodigalloyl) s karboxylovou skupinou jedné jednotky a hydroxylové skupiny ortho s karboxylem další jednotky. Příkladem je agrimoniin (m-GOG) vyskytující se v čeledi *Rosaceae*, především v *Agrimonia eupatoria* – rostlině poskytující drogu Agrimoniae herba, jejíž obsahové látky a její antiradikálová aktivita je zkoumána v experimentální části této práce, dále v rodech *Potentilla* a *Rosa.* Dalším příkladem je nupharin v zástupcích čeledi *Nymphaeaceae.*
2. Skupina DOG. Vazebná jednotka je tergalloyl (tj. p-DOG) nebo valoneoyl (tj. m-DOG). Etherová vazba zahrnuje vazbu hydroxylu v meta- nebo para-poloze se zbytkem hexahydroxydifenové kyseliny (HDDP = D). Příkladem tohoto typu jsou rugosiny a oenothin (který má navíc makrocyklus) z různých zástupců čeledi Oenotheraceae (Oenothera sp., Epilobium sp.) a Lythraceae.

3. Skupina GOD. Oxidativní vazba mezi atomem uhlíku zbytku HHDP a atomem kyslíku hydroxylové skupiny zbytku kyseliny gallové spojí dva monomery: vzniklá látka se nazývá „sanguisorbyl“. Příkladem je sanguiin z rodů Sanguisorba a Rubus z čeledi Rosaceae.

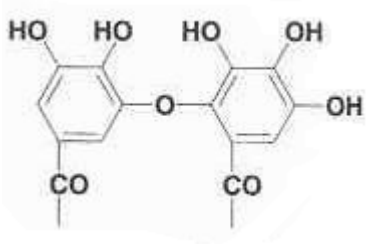
4. Skupina D(OG)2 (m,m´-; m,p-). Jednotka spojující dva monomery obsahuje dvě etherové vazby mezi hydroxylovými skupinami dvou galloylových jednotek a jedné HHDP jednotky, nachází se např. v euphorbinech. Struktura bývá někdy i makrocyklická.

5. Oligomerní C-glykosidické ellagotanniny, např. roburiny z dubového dřeva.

Sloučeniny obsahující jiný cukr než glukóza jsou vzácné, byly však popsány. Ke známým látkám patří hamamelitannin (2´,5-di-O-galloyl-α-D-hamamelosa), který někdy není považován za třeslovinu pro svoji nízkou molekulovou hmotnost.

Někdy jsou za třísloviny považovány i polymery floroglucinolu (halogenovaného i nehalogenovaného) izolované z některých druhů řas. Tyto polymery jsou též známé jako florotanniny.

K třeslovinám patří také flavanol-galláty, glykosyl-flavanol-galláty (některé z nich mají vlastnosti podobné hydrolyzovatelným třeslovinám) vyskytující se v *Thea sp.* a galláty fenolických glykosidů, jako je galloyl-derivát arbutinu izolovaný z *Arctostaphylos sp. (Ericaceae)* nebo *Bergenia (Saxifragaceae).* (1)



Obr.7: Dehydrodigalloyl-

3.2.2. Kondenzované třísloviny (proanthocyanidiny)

Kondenzované třísloviny (proanthocyanidiny) jsou polymerní flavany. Skládají se z jednotek flavan-3-olu, katechinu a epikatechinu spojených C-C vazbami, nejčastěji 4→8 nebo 4→6, které vznikají spojováním elektrofilního C_4 flavanylové jednotky (flavan-4-ol nebo flavan-3,4-diol) a nukleofilního C_8 (méně často C_6) jiné jednotky (většinou flavan-3-

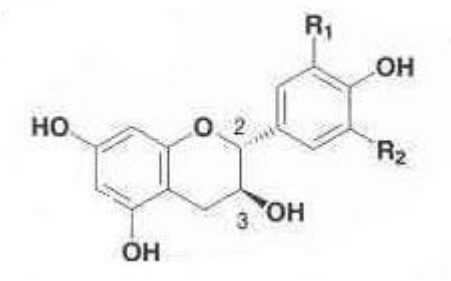
ol). Proanthocyanidiny byly identifikovány ve všech skupinách rostlin, včetně nahosemenných a kapraďorostů. (1)

3.2.2.1. Struktura kondenzovaných tříslovin (proanthocyanidinů)

Nomenklatura proanthocyanidinů byla původně založna na názvech anthocyanidinů vznikajících reakcí polymeru s kyselinou za vysoké teploty: procyanidin, prodelphinidin, propelargonidin. Nyní častěji vychází z názvu monomeru, ze kterého je molekula sestavena. Ačkoliv se konvenčně používají triviální názvy, je doporučeno pojmenovávat struktury dle pravidel inspirovaných nomenklaturou oligo- a polysacharidů – název jednotky a označení polohy a směru vazby (event. vazeb) v závorkách. Například aesculitannin A je epikatechin-(4β→8)-epikatechin-(4β→8,2β→7)-epikatechin-(4β→8)-epikatechin.

Základní strukturální jednotka těchto polymerů je flavan-3-ol: katechin a epikatechin (3,5,7,3´,4´-pentahydroxylovaný flavan, součást procyanidinů), gallokatechin a epigallokatechin (3,5,7,3´,4´,5´-hexahydroxylovaný flavan, součást prodelphinidinů), fisetidinin (3,7,3´,4´-tetrahydroxylovaný flavan, složka profisetidininů) a méně časté afzelechin a epiafzelechin (3,5,7,4´-tetrahydroxylovaný flavan, součást propelargonidinů). Biogeneticky vznikají tyto flavan-3-oly v metabolismu flavonoidů. Jsou tvořeny 3-hydroxylací flavanonu. Vznikající 2,3-dihydroflavon-3-oly jsou následně redukovány na flavan-3,4-dioly a pak na flavan-3-oly mechanismem, který ještě není zcela objasněn. Obvyklá konfigurace flavan-3-olů je (*2R, 3S*) nebo (*2R, 3R*) u řady epi-. Enantiomery jako ent-katechin (*2S, 3S*) jsou vzácnější.

Chemicky zahrnuje tvorba oligomerů a polymerů flavan-3,4-dioly: tyto molekuly, které jsou vysoce reaktivní díky charakteru svých 4-OH skupin, tvoří snadno karboniový kation, který bezprostředně reaguje buď s nukleofilním C_8, nebo C_6 flavan-3-olu. Opakování tohoto kroku vede k oligomerům a polymerům.(1)



Obr.8:

2R, 3S řada:

$R_1 = R_2 = H$; Afzelechin

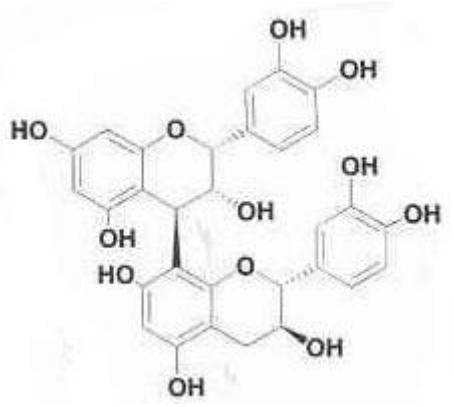
$R_1 = OH$, $R_2 = H$; Katechin

$R_1 = R_2 = OH$; Gallokatechin

2R, 3R řada: (OH-3-α): Epiafzelechin, Epikatechin, Epigallokatechin

3.2.2.2. Proanthocyanidiny typu B

Nejjednodušší dimery jsou procyanidiny B-1 (obr.9), B-2, B-3 a B-4, jinak řečeno proanthocyanidiny tvořené dvěma jednotkami (*2R,3S*)-(+)-katechinu, (*2R,3R*)-(-)-epikatechinu nebo po jedné jednotce každého spojených 4→8 vazbou v konfiguraci α (B-3 a B-4) nebo β (B-1 a B-2). Tyto procyanidiny se vyskytují jako volné a jsou široce rozšířené. (1)



Obr.9: Procyanidin B-1

3.2.2.3. Proanthocyanidiny typu A

Tato důležitá skupina procyanidinů se skládá z dimerů s dvojí interflavanoidní vazbou: $C_4 \rightarrow C_8$ a $C_2 \rightarrow O \rightarrow C_7$. Nejznámější jsou aesculitanniny, vyskytující se v osemení *Aesculus sp.*, vyskytují se také v kůře rodu *Cinnamomum.*

Ve skupině A, stejně jako ve skupině B, může být vazba $C_4 \rightarrow C_8$ nahrazena vazbou $C_4 \rightarrow C_6$ (např. procyanidin B-5). Ostatní dimery (propelargonidiny, prodelphinidiny) jsou méně časté. Známé jsou i procyanidin-O- a –C-glukosidy (obsažené v drogách Rhei radix a Theae folium), $C_6' \text{-} C_6'$dimery (Theae folium), dimery obsahující chalkan (assamicainy) a enantiomerní dimery, jako je ent-procyanidin. (1)

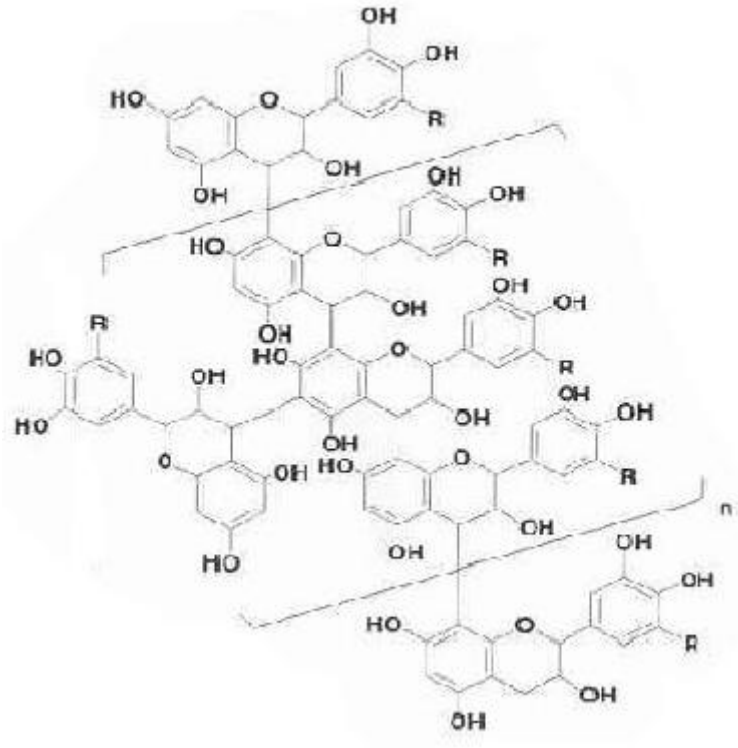
3.2.2.4. Oligomery

Oligomery jsou tvořeny postupným spojováním jednotek flavanu. Mnoho struktur je nyní známo ve skupině B: C_1-trimery (tři molekuly epikatechinu s 4β→8 vazbami), C_2-trimery (tři molekuly katechinu s 4β→8 vazbami) a odpovídající oligomery. Skupina A zahrnuje trimery a oligomery vytvořené připojením jednotky flavanu k dimeru, jehož monomerní jednotky jsou vázány dvěma vazbami (např. aesculitanniny a cinnamtanniny). (1)

3.2.2.5. Polymery

Polymery mohou obsahovat až 50 monomerních jednotek. Nejrozšířenější jsou polyepikatechiny a kopolymery procyanidinu a prodelphinidinu (obr.9). Interflavanoidní vazba je především typu $C_4 \rightarrow C_8$ a je vždy trans- k 3-hydroxylové skupině (tj. je-li monomerní jednotka epikatechin */3R/*, pak C_4 je *R*). Studium molekulárních modelů odhalilo částečnou překážku v rotaci molekuly okolo interflavanoidní vazby, čímž vzniká v polymeru levotočivý nebo pravotočivý helix jako funkce prekurzoru (B-1, B-2 nebo B-3, B-4). Ostatní polymery (propelargonidiny a polymery flavan-3-olu) jsou vzácnější a vyskytují se v jednoděložných rostlinách. (1)

Monomery flavanoidu se mohou vázat s kyselinou kávovou za vzniku laktonu a kondenzované třísloviny se mohou vyskytovat také jako galloyl-estery.



Obr.10: R = H: procyanidin, R = OH: prodelphinidin

3.3. Fyzikálně chemické vlastnosti, extrakce, důkaz, stanovení

3.3.1. Vlastnosti

Třísloviny se rozpouštějí ve vodě za tvorby koloidních roztoků, jejich rozpustnost se však mění stupněm polymerace. Jsou rozpustné v alkoholech a acetonu. Stabilita vodných roztoků je malá, mění se se strukturou. Třísloviny reagují, tak jako všechny fenoly, s chloridem železitým. Soli těžkých kovů a želatina je srážejí z vodných roztoků. Hydrolyzovatelné a kondenzované třísloviny mohou být rozlišeny na základě chování v kyselém prostředí za vysoké teploty:

Hydrolyzovatelné třísloviny jsou polyestery glukózy a při hydrolýze uvolňují cukr a kyselinu gallovou, kyselinu hexahydroxydifenylovou nebo obojí. Kyselina hexahydroxydifenylová rychle přechází na kyselinu ellagovou. Hydrolýza oligomerů vede též ke sloučeninám s třemi nebo čtyřmi aromatickými kruhy, jejichž struktury závisí na druhu vazby mezi monomery. Např. rugosin D vzniklý tvorbou difenyletherové vazby mezi zbytkem kyseliny gallové a HHDP dává hydrolýzou produkt se třemi cykly – tzv. valoneovou kyselinu (ve skutečnosti jde o dilakton).

V případě polygalloylglukóz s depsidickým bočním řetězcem mohou být depsidické vazby rozštěpeny v přítomnosti kyseliny mléčné při běžné teplotě a za těchto podmínek zůstávají neporušené esterové vazby, které zahrnují glukózové OH skupiny.

U kondenzovaných tříslovin dochází za stejných experimentálních podmínek ke štěpení vazeb mezi flavany a za přítomnosti vzduchu vede vytvořený karboniový kation k anthocyanidinům. Za kontrolovaných podmínek může být tato reakce použita k objasnění struktury; reaktivní meziprodukt může být zachycen vhodným nukleofilním činidlem. Tímto činidlem může být alkohol nebo thiol (toluen-2-thiol) , ale také deriváty flavanu, což vysvětluje, proč reakcí vznikají i nerozpustné tmavé polymery – flobafeny. (1)

3.3.2. Extrakce

Třísloviny jsou obecně extrahovány směsí vody a acetonu (methanol se nepoužívá, neboť rozkládá galloyldepsidy). Optimální výtěžek je získáván z čerstvých či zmrazených nebo lyofilizovaných částí rostlin – ne po usušení, neboť tehdy je v rostlinách část tříslovin ireverzibilně vázána s jinými polymery. Po odstranění acetonu destilací jsou barviva a tuky z vodných roztoků odstraněny extrakcí (např. dichlormethanem). Poté jsou extrakcí ethylacetátem separovány dimerní proanthocyanidiny a většina gallotaninů. Polymerní proanthocyanidiny a vysokomolekulární gallotanniny zůstávají ve vodné fázi. K získání čistých látek slouží vhodné chromatografické metody, nejčastěji metody založené na gelové filtraci. Následuje chromatografie na reverzní fázi opět ve směsi vody a alkoholu nebo vody, alkoholu a acetonu. (1)

3.3.3. Důkaz

Se solemi železa dávají gallotanniny a ellagotanniny modravě černé zbarvení a sraženiny, kondenzované třísloviny zelenohnědé sraženiny.

Gallotanniny poskytují s jodičnanem draselným růžové zbarvení (volná kyselina gallová dává s tímto činidlem zbarvení oranžové). Ellagotanniny se barví kyselinou dusitou v přítomnosti kyseliny octové nejdříve do růžova, poté se barva mění přes nachovou až na modrou. Kondenzované třísloviny se barví červeně vanilinem a kyselinou chlorovodíkovou.

K analýze extraktů se užívají konvenční techniky: TLC (na celulóze nebo silikagelu) s vizualizací pomocí fluorescence pod UV lampou a detekce činidly zmíněnými již výše, nebo HPLC (reverzní fáze s mírně kyselým alkoholem). (1)

3.3.4. Stanovení

Stanovení obsahu třísloviny je komplikované, protože je nesnadné dosáhnout kompletní extrakce a ne všechny metody založené na fenolickém charakteru těchto sloučenin jsou specifické. Přesto některé poněkud specifické jsou, zvláště pro kondenzované třísloviny. Nejlepší metody pro detekci a stanovení měří jejich specifickou schopnost precipitovat proteiny. (1)

3.3.4.1. Stanovení založená na precipitaci proteinů

Jednou z nejpoužívanějších metod je metoda založená na tvorbě komplexů třísloviny s hemoglobinem. Zbylý nevysrážený hemoglobin může být poté stanoven kolorimetricky proti slepému vzorku.

Jinou, příbuznou metodou, je postup, v kterém je hemoglobin nahrazen hovězím sérovým albuminem. Protein je solubilizován při pH rovném jeho izoelektrickému bodu, pak je vysrážen třísloviny obsaženými v extraktu a stanoven. Koncentrace proteinu v precipitátu je určena kolorimetricky po alkalické hydrolýze a reakci s ninhydrinem.
Postup je jednodušší, je-li albumin předem označen barvivem.

Tradiční metoda používající kožní prášek je též založena na reakci třísloviny s proteiny. Tato metoda je stále používána, je lékopisná. Připraví se nejprve výluh drogy, jeden alikvotní díl se odpaří pro určení všech rozpustných látek a v druhém alikvotním dílu jsou třísloviny precipitovány přidáním kožního prášku. Precipitát se odstraní a supernatant se odpaří do sucha. Rozdíl hmotnosti odpovídá hmotnosti třísloviny obsažených v alikvotním dílu. (1)

3.3.4.2. Stanovení kondenzovaných třísloviny

Proanthocyanidiny mohou být stanoveny měřením absorbance zbarvení vzniklého konverzí na anthocyanidiny varem s n-butanolem za přítomnosti kyseliny chlorovodíkové. Depolymerizace je urychlena a reprodukovatelnost reakce je zlepšena přidáním soli železa

k reakčnímu médiu (ale absorbance se při dané vlnové délce mění v závislosti na struktuře vzniklého anthocyanidinu.)

Proanthocyanidiny mohou být také stanoveny jako produkty adice vanilinu v methanolu v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové. Vanilin tvoří adukt na C_6 flavanových jednotek, které jsou dihydroxylovány na C_5 a C_7. Též lze použít p-dimethylamino-benzaldehyd.

Thiolýza následovaná HPLC je též používaná metoda stanovení, zejména pro neextrahovatelné proanthocyanidiny. (1)

3.3.4.3. Stanovení hydrolyzovatelných tříslovin

Gallotanniny mohou být hydrolyzovány v přítomnosti kyseliny sírové, následuje reakce vzniklé kyseliny gallové s rhodaminem a měří se absorbance produktu. Je možno použít i reakci s jodičnanem draselným.

Konvenčí metoda pro ellagotanniny zahrnuje reakci s kyselinou dusitou po hydrolýze kyselinou sírovou. Nesubstituované atomy uhlíku vzniklé kyseliny ellagové jsou ochotné k elektrofilnímu ataku za tvorby chinonového oximu. (1)

3.3.4.4. Stanovení celkových fenolů

Obecná metoda pro stanovení celkových fenolů se někdy používá ve spojení s precipitačními technikami s kožním práškem k měření celkového množství tříslovin v droze. Proces je založen na tzv. Folin-Denisově metodě: fenolátový ion vytvořený přidáním uhličitanu sodného je oxidován směsí kyseliny fosfowolframové a fosfomolybdenové, která je současně redukována za vzniku modrého roztoku; měří se jeho absorbance. (1)

3.4. Biologické vlastnosti tříslovin

Většina biologických vlastností tříslovin je spojená s jejich schopností tvořit komplexy s makromolekulami, především s proteiny (trávicí a jiné enzymy, proteiny hub nebo virů).

Reverzibilní tvorba komplexů. Za fyziologického pH a zamezení oxidaci je tvorba komplexů (vodíkovými vazbami a jinými interakcemi) reverzibilní. Mechanismem se zdá být nespecifický povrchový jev. Třísloviny tvoří na povrchu proteinu vrstvu, která je méně hydrofilní než samotný protein, a to působí precipitaci; dále vytvářejí (v koncentrovaných roztocích proteinů) vazby mezi molekulami proteinů. Afinita tříslovin k proteinům stoupá s počtem zbytků prolinu v proteinech a s flexibilitou konformace proteinů (proteiny slin, kolagen). Tato afinita silně závisí na molekulové hmotnosti tříslovin a největší je u pentagalloylglukózy a jejích oligomerů. Tvorba bifenylových vazeb (HHDP) snižuje volnost konformace molekuly a redukuje její afinitu k proteinům. Rigidní struktury jako například vescalagin mají velmi nízkou afinitu k proteinům. Z téhož důvodu mají proanthocyanidiny, u kterých je omezená rotace okolo interflavanoidní vazby, nižší afinitu k proteinům než polygalloylestery.

Ireverzibilní tvorba komplexů. Vzhledem k tendenci spontánně oxidovat tvoří polyfenoly jako třísloviny o-chinony, které reagují s nukleofilními skupinami proteinů a tvoří kovalentní vazby. Komplex se tak stává ireverzibilní (v případě proanthocyanidinů v kyselých podmínkách mohou být do těchto vazeb zahrnuty flavanové karbokationty).

Pokroky v oblasti čištění a strukturální analýzy tříslovin umožnily získání čistých látek použitelných k výzkumu jejich biologických vlastností. Některé vlastnosti se projevily *in vitro*. Je známo jen velmi málo o absorpci a metabolismu tříslovin, těžko tedy diskutovat o jejich terapeutických účincích. Přesto se tyto drogy používají, především ve fytoterapii. (1)

3.4.1. Terapeutické účinky založené na adstringentním působení

Použití drog obsahujících třísloviny plyne z jejich afinity k proteinům. Zevně zvyšují odolnost vrchních vrstev kůže a sliznic vůči vodě, tedy chrání níže položené vrstvy. Mají též vazokonstrikční efekt na malé povrchové cévy. Omezením ztrát tekutin a prevencí zevních poškození urychlují třísloviny regeneraci tkání u povrchových ran nebo popálenin. Vnitřně působí proti průjmům. Bez ohledu na způsob podání mají tyto sloučeniny antiseptický účinek (antibakteriální a antifungální), který je významný při léčbě infekčních průjmů a zánětlivých onemocnění kůže. (1)

3.4.2. Antioxidační účinek

Mnoho třísloviny, zvláště hydrolyzovatelných, inhibuje peroxidaci lipidů indukovanou ADP a kyselinou askorbovou v jaterních mitochondriích u krys. *In vitro* působí zvláště HHDP estery glukózy jako vychytávače volných radikálů a inhibitory tvorby superoxidových iontů a některé z nich inhibují 5-lipoxygenázu (ne však cyklooxygenázu) v peritoneálních granulocytech u krys.

Několik látek zabraňuje autooxidaci methyllinoleátu. In vitro snižuje geraniin (nebo jeho metabolit) hladinu peroxidovaných lipidů v séru krys.

Antioxidační flavanoly a proanthocyanidiny obsažené ve šťávě z hroznů nebo ve víně, a v semenech révy vinné, jsou obecně považovány za hlavní účinné látky zodpovědné za preventivní vliv na kardiovaskulární onemocnění. (1)

Polyfenoly zeleného čaje, zahrnující epigallokatechin-3-gallát (EGCG), epigallokatechin (EGC), epikatechin-3-gallát (ECG), mají velmi vysokou antitadikálovou a antioxidační aktivitu, zvláště EGCG; dokonce větší než antioxidační vitaminy C a E. Epidemiologické studie prokázaly souvislost mezi zvýšenou konzumací zeleného čaje a snížení rizika mnoha typů nádorů. Příčinou je inhibice lipidové peroxidace indukované 4-nitrochinolinoxidem (ve vodě rozpustný kancerogen), která indukuje vícestupňovou kancerogenezi. (9)

Resveratrol (3,4´,5-trihydroxystilben), polyfenol z červeného vína, zmírňuje ethanolem vyvolaný oxidativní stres, tento efekt byl pozorován u krys. (10)

3.4.3. Enzymatická inhibice

Obecně jsou třísloviny inhibitory enzymů. Inhibují 5-lipoxygenázu (geraniin, corylagin), což má za následek například potlačení astmatu, zánětu či alergických reakcí vyvolaných prostřednictvím leukotrienů; dále angiotenzin konvertující enzym (ACE), čímž působí antihypertenzívně, dále pak inhibují aktivaci hyaluronidázy a inhibují glukosyltransferázy mikroorganismů. Sanguiin H-6 nebo chebulová kyselina inhibují topoisomerázy, ellagotanniny a komplexní třísloviny inhibují proteinkinázu C. (1)

3.4.4. Ostatní účinky

Některé ellagotanniny působí proti mutagenitě určitých karcinogenů a nepříznivě při transplantaci experimentálních tumorů (stimulují imunitní mechanismy). *In vitro* byl též popsán inhibiční účinek na replikaci virů: inhibice adsorpce virů na buňky a inhibice reverzní transkriptázy dimery a galloyl-deriváty.

V roce 1997 byly publikovány výzkumy, které ukázaly na základě experimentů s vazbou radioaktivně značených ligandů na receptory, že u 10 ze 16 typů receptorů ve studii nebyla vazba ligandu inhibována třís lovinami nebo jinými fenoly a že některé polyfenoly inhibovaly selektivně jeden či dva typy receptorů.

Dimery procyanidinu z kvetoucích vrcholků hlohu (*Crataegi flos*), patrně zodpovědné za pozitivně inotropní a koronární vazodilatační účinky, mají vlastnosti podobné flavonoidům: snižují kapilární fragilitu a permeabilitu, zvyšují cévní tonus a stabilizují kolagen. Jejich inhibiční účinek na histidindekarboxylázu, elastázu a ACE byl experimentálně prokázán. Procyanidiny B-2, B-3, B-4 inhibují vazbu serotoninu na $5HT_1$ receptory. (1)

Helicobacter pylori, původce vředové choroby žaludku, je inhibován mnoha hydrolyzovatelnými třís lovinami. Účinnost β-laktamů na rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* bývá obnovena například corilaginem či tellimagrandinem I. (11)

Toxické účinky třís lovin na lidský organismus nejsou známy. (1)

4. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK *IN VITRO*

V literatuře lze nalézt mnoho metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity.Jejich rozmanitost plyne ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Nejčastěji jde o přímou reakci s radikály (zhášení, vychytávání) nebo reakci s přechodnými kovy. Přesnější vymezení mechanismu jejich účinku je však z chemického hlediska problematické. Postupy hodnotící míru antioxidačního působení mohou být obecně kategorizovány do dvou skupin – na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a dále na metody posuzující redoxní vlastnosti látek. (7)

4.1. Metody založené na eliminaci radikálů

Spočívají v hodnocení schopnosti vzorku vychytávat volné radikál. Radikály mohou být v reakční směsi generovány nebo jsou do ní přidávány. Z chemického hlediska jde o radikály kyslíkové (hydroxyl, peroxyl, superoxidový anion-radikál) nebo syntetické stabilní radikály (DPPH$^{\cdot}$, ABTS$^{\cdot+}$, galvinoxyl). Zvláštní skupinu pak tvoří metody testující schopnost inhibovat nebo zpomalovat lipidovou peroxidaci. (7)

4.1.1. Metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů

4.1.1.1. Metoda používající ABTS (metoda TEAC)

Je jednou ze základních a nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity TAA. Testuje schopnost vzorku či látek zhášet radikál ABTS$^{\cdot+}$ (2,2′-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Je také označována jako metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), vzhledem k tomu, že výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitousyntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina).

Zhášení radikálu ABTS antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, se sleduje spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra ABTS radikálu (nejčastěji se měří absorbance při 734 nm). V reakční směsi se kation-radikál ABTS generuje oxidací ABTS. Převážně je používán systém ABTS/H_2O_2/peroxidasa nebo

ABTS/methmyoglobin/H_2O_2. Jsou též uváděny i možnosti chemické oxidace ABTS, například peroxodisíranem draselným nebo oxidem manganičitým. Při vlastním experimentálním měření se užívají dva postupy. V prvém se antioxidant přidává do reakční směsi, ve které byl již vytvořen radikál $ABTS^{\cdot+}$, při druhém postupu je antioxidant v reakční směsi přítomen při generování radikálu $ABTS^{\cdot+}$. Častěji se užívá uspořádání, při němž antioxidant přidává k radikálu $ABTS^{\cdot+}$ již vyprodukovanému pomocí peroxidázy. Stanovení celkové antioxidační aktivity lze provádět i komerčně vyráběnými sety. Používá se i mikrotitrace na mikrotitračních destičkách.

TAA vzorků se hodnotí parametrem TEAC. Označuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství Troloxu. Pro čisté látky je TEAC definována jako milimolární koncentrace Troloxu vykazující stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka při koncentraci 1 mmol/l. Pro směsi TEAC udává koncentraci Troloxu (mmol/l), která je rovna antioxidační aktivitě vzorku.

Pro spektrofotometrickou metodu stanovení celkové antioxidační aktivity s ABTS jsou popsány aplikace měření v hydrofilním i lipofilním prostředí. Rovněž byla vypracována metoda kombinující HPLC separaci látek s následnou detekcí radikálových zhášečů na základě reakce s $ABTS^{\cdot+}$.

Metoda stanovení TAA vzorků pomocí ABTS je jednoduchá, rychlá v provedení a má široké uplatnění, od hodnocení antioxidační aktivity látek různého původu až po směsné vzorky. (7)

4.1.1.2 Metoda používající DPPH

Tato metoda je považována za jednu ze základních pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. Spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Reakce je sledována nejčastěji spektrofotometricky. Pokles absorbance při 517 nm se měří buď po uplynutí určitého konstantního času nebo se pracuje v kinetickém režimu. Test lze provádět i na mikrotitračních destičkách. Lze použít i detekci HPLC, při které je hodnocen pík radikálu DPPH, toto je výhodné zejména u barevných vzorků, kdy se na rozdíl od spektrofotometrie zabarvení vzorku eliminuje.

U směsných vzorků se antiradikálová aktivita někdy vyjadřuje v ekvivalentech askorbové kyseliny nebo v jednotkách standardu Troloxu. Jsou používány aplikace na

TLC, vhodné pro screening radikálové zhášecí aktivity směsných vzorků. Podobnou modifikací je kombinace testu se separací látek ze směsi metodou HPLC, kdy látkyrozdělené na koloně reagují kontinuálně s DPPH a spektrofotometricky se detekuje pík radikálu. (7)

4.1.1.3. Metoda používající galvinoxyl

K metodám využívajícím reakci antioxidantu se stabilními radikály patří také test s galvinoxylem(2,6-di-terc-butyl-4-[(3,5-di-terc-butyl-4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden) methyl]fenoxyl). Princip metody spočívá v redukci stabilního radikálu galvinoxylu látkami poskytujícími vodík podobně jako při testu DPPH. Reakce se sleduje spektrofotometricky při vlnové délce 428 nm nebo na základě ESR. (7)

4.1.1.4. Využití jiných stabilních radikálů

Pro hodnocení schopnosti látek poskytovat vodíkový atom nebo elektron se používá také syntetický volný radikál Fremyho sůl (nitrosodisulfonan draselný), detekce a hodnocení reakce se provádí pomocí ESR. (7)

4.1.2. Metody hodnotící eliminaci kyslíkatých radikálů

4.1.2.1 Metoda ORAC

Při použití metody ORAC (oxygen radical absorbance capacity) se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence β-fykoerythrinu (β-PE) po ataku radikály. Pro generaci kyslíkových radikálů se používá AAPH (2,2´-azobis (isobutyrimidamid)-dihydrochlorid), při generaci hydroxylových radikálů pak systém peroxid vodíku + mědnaté ionty. Protože tyto radikály patří k nejreaktivnějším, patří tento test k důležitým parametrům charakterizujícím antioxidanty. Při stanovení antioxidační kapacity polyfenolů však byla popsána některá omezení, která se týkají vlastností β-PE (například omezená fotostabilita). (7)

4.1.2.2 Metody založené na vychytávání OH-radikálů

Při těchto metodách jsou OH-radikály generovány různými postupy – Fentonovou reakcí, UV fotolýzou peroxidu vodíku, fotolýzou syntetických derivátů.

Detekce je založena na vychytávání radikálu látkami, jejichž reakční produkty lze snadno stanovit. Antioxidanty vychytávající OH-radikály snižují tvorbu těchto produktů. Jedním z možných postupů je vychytávání OH-radikálů salicylovou kyselinou. Vznikají hydroxylované produkty salicylové kyseliny, jejichž detekce a kvantifikace se provádí metodou HPLC s UV detekcí. Jiným postupem je použití 2,2-dimethyl-2H-pyrrol-1-oxidu (DMPO) jako lapače OH-radikálů. Vzniklý adukt může být kvantifikován pomocí ESR nebo HPLC-ECD. Další možností je vychytávání OH-radikálů deoxyribózou, jejíž degradační produkty jsou stanovovány reakcí s thiobarbiturovou kyselinou (TBA). Výhodou tohoto postupu je možnost stanovení jak antioxidačních, tak i prooxidačních vlastností látek. Vychytávání OH-radikálů lze rovněž sledovat specifickou chemiluminiscenční sondou indoxyl-β-glukuronidem (IBG). (7)

4.1.2.3 Metody založené na vychytávání superoxidového anion-radikálu

K produkci radikálu se využívá např. neenzymová reakce 5-methylfenazinium-methyl-sulfátu a NADH nebo systém xanthin/xanthinoxidáza. Vzniklý radikál redukuje nitrotetrazoliovou modř, detekce se provádí spektrofotometricky při 550-560 nm. V testech UV může být nitrotetrazoliová modř nahrazena syntetickým formazanovým barvivem WST-1, které je vzhledem k dobré rozpustnosti vhodnější pro provádění testu na mikrotitračních destičkách. Dalším používaným postupem je kombinace HPLC a chemiluminiscence. Měří se inhibice chemiluminiscence luminolu látkami separovanými při HPLC. Jelikož luminol je schopen reagovat s různými reaktivními kyslíkovými radikály, postihuje tato metoda široké spektrum antioxidační aktivity látek. (7)

4.1.2.4 Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace

Lipidová peroxidace vyvolaná volnými radikály je jedním z nejvýznamnějších patologických pochodů v organismu. Látky potlačující lipidovou peroxidaci mohou eliminovat jak iniciační kyslíkové radikály (OH·), tak sekundárně vznikající radikálové meziprodukty (peroxyl, alkoxyl) a mohou též působit jako látky chelatující ionty

přechodných kovů. Navíc je účinek antioxidantu *in vivo* ovlivněn jeho lipofilitou. Bylo vyvinuto mnoho metod hodnotících vliv antioxidantů na lipidovou peroxidaci, od nejjednodušších, které jsou prováděny s jednoduchými lipidy a v jednoduchých fázových systémech, až po složitější biologické modely stimulující situaci *in vivo* a využívající biologické membrány jako matrici. Častým postupem je užití fosfolipidových liposomů. Jinou možností je studium na mikrosomech. Další modifikací je sledování lipidové peroxidace na tkáňových homogenátech, mitochondriích nebo LDL-částicích.

K nejjednodušším testům patří metody založené na detekci produktů peroxidace linolové kyseliny. Jako iniciátor radikálové reakce je často užíván AAPH, produktyperoxidace jsou sledovány spektrofotometricky při 234 nm. Metoda je prováděna v řadě modifikací lišících se přípravou lipidové fáze a způsobem detekce. Často je užíván postup využívající spřaženou oxidaci β-karotenu a linolové kyseliny vzdušným kyslíkem. Antioxidační účinek látek je hodnocen spektrofotometricky při vlnové délce 470 nm podle spotřeby β-karotenu, přičemž provedení je možné i na mikrotitračních destičkách. Stanovení se také provádí v modifikaci na TLC. Metoda s β-karotenem se užívá pro hodnocení vzorků TAA, je vhodná i pro screening směsných vzorků.

Jednou z nejpoužívanějších metod k hodnocení schopnosti látek eliminovat lipidovou peroxidaci je metoda TBA-MDA. Je založena na stanovení jednoho ze sekundárních produktů lipidové peroxidace malondialdehydu (MDA) na základě jeho barevné reakce s kyselinou thiobarbiturovou (TBA), měří se absorbance při 532 nm. Spektrofotometrické stanovení aduktů TBA-MDA je jednoduché a citlivé, ale nespecifické, zahrnuje stanovení všech látek reagujících s TBA (TBARs produkty). Výhodou je, že test lze provést i na mikrotitračních destičkách. Specifičtějším vyhodnocením kvantity aduktů TBA-MDA je metoda HPLC. (7)

4.2. Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Neenzymové antioxidanty mohou být charakterizovány jako redukční činidla, která reagují s oxidanty, redukují je a tím je inaktivují. Z tohoto pohledu lze antioxidační aktivitu posuzovat na základě redukční schopnosti látky. (7)

4.2.1. Metody chemické

4.2.1.1. Metoda FRAP (ferric reducting antioxidant potential)

Je založena na principu redoxní reakce. Při této metodě redukují antioxidanty ze vzorku komplex Fe^{3+}-2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)(Fe^{3+}-TPTZ). Nárůst absorbance při 593 nm odpovídající množství komplexu Fe^{2+}-TPTZ je mírou antioxidační aktivity vzorku. Metoda má své limity spočívající v tom, že měření pobíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH (3,6), nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolické látky a thioly, navíc vznikající železnaté ionty jsou *in vivo* jedním z reaktantů Fentonovy reakce. Metoda FRAP tak odráží pouze schopnost látek redukovat železité ionty a s celkovou antioxidační aktivitou nemusí pozitivně korelovat. (7)

4.2.2. Metody elektrochemické

4.2.2.1. Cyklická voltametrie

Redoxní vlastnosti látek je možné hodnotit cyklickou voltametrií, která indikuje schopnost látek odštěpovat elektrony. Při této metodě se na pracovní elektrodu vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a současně se sledují proudové odezvy v roztoku studované látky. Získaný záznam zachycuje křivka – tzv. cyklický voltamogram. Redukční schopnost látek se vyhodnocuje dvěma parametry, a to z potenciálu anodického oxidačního píku E_A a jeho anodického proudu I_A. Čím nižší je hodnota E_A, tím snáze látka odevzdává elektrony a může být lepším antioxidantem. Z hodnoty výšky proudu anodického píku I_A je možné určit koncentraci látek. Cyklická voltametrie je vhodná pro získání informace, zda látka je schopná snadno odevzdávat elektrony a poté je možno zvolit určitou metodu na stanovení antioxidační kapacity. Je prokázáno, že v řadě případů hodnoty E_A korelují s antioxidační aktivitou látek určenou jinými metodami, například s lipoperoxidací nebo DPPH. (7)

4.2.2.2. HPLC metoda s elektrochemickou detekcí

Elektroaktivní látky je možné velmi přesně a citlivě detekovat použitím amperometrických nebo coulochemických detektorů při analýze HPLC (HPLC-ECD). Při této metodě se na pracovní elektrodu detektoru vkládá určitý kladný potenciál. Pík látky se projeví pouze tehdy, je-li látka při tomto potenciál oxidována. Látku tak lze charakterizovat nejen retenčním časem, ale též potenciálem, při kterém se oxiduje. To umožňuje analyzovat komplexní směsi a identifikovat v nich jednotlivé účinné antioxidační složky na základě hodnoty potenciálu aplikovaného na elektrodu. Při analýze neruší zbarvení směsi, ale je nutné dodržet vysokou čistotu reagencií v mobilní fázi (včetně snížení koncentrace stopových prvků). Hodnocení antioxidačních vlastností látek pomocí HPLC-ECD koreluje s různými jinými metodami na testování celkové antioxidační aktivity látek, např. s metodou DPPH. (7)

5. AGRIMONIAE HERBA – ŘEPÍKOVÁ NAŤ

5.1. Matečná rostlina – název, zařazení

Podle ČL 2002 jsou to o usušené kvetoucí vrcholky řepíku lékařského (*Agrimonia eupatoria L.)* z čeledi *Rosaceae*. Lékopis požaduje nejméně 2,0 % tříslovin, počítáno jako pyrogalol, na vysušenou drogu. (2)

5.2. Agrimonia eupatoria L. – řepík lékařský

Vytrvalá bylina, 15 – 150 cm vysoká, s třemi typy chlupů (dlouhé krycí, kratší krycí, žlaznaté). Lodyha tuhá, přímá, jednoduchá či chudě větvená, přibližně oblá, s listy více nahlučenými v dolní části nebo vzácněji rovnoměrně olistěná. Krycí chlupy na povrchu bradavčité. Listy přetrhovaně lichozpeřené, na líci tmavě zelené, na rubu šedo-běloplstnaté, v dolní části lodyhy s třemi až čtyřmi hlavními jařmy lístků, s dlouhými krycími chlupy na žilkách i s kratšími zakřivenými krycími, na ploše tvořícími plst a s menším počtem žlaznatých chlupů; lístky hlavních jařem obvykle obvejčité až eliptické, tupé až ostře špičaté, na celém okraji oboustranně s šesti až deseti hrubými, tupými až ostrými zuby, koncový lístek jen nezřetelně větší než ostatní a zpravidla přisedlý; palisty polosrdčité, 1,2 až 1,8 cm široké, s nepočetnými hlubšími zářezy. Hrozen hustý, asi padesátikvětý, většinou jediný, květní stopky cca 2 mm dlouhé, listence celistvé nebo trojlaločné, perikladia po odkvětu nicí. Květy zlatožluté, obvykle 7 – 10 mm v průměru, kališní cípy vejčité a špičaté; korunní lístky obvejčité, na vrcholu zaokrouhlené. Zralé češule obráceně kuželovité, asi 5 mm dlouhé a 4 mm široké, přitiskle chlupaté, nejméně do 3/4 hluboce brázdité, s menším počtem žlázek, s nevýrazným prstencovitým valem s háčky; vnitřní háčky přímé, vnější přímo až rovnovážně odstálé.

Výskyt. Xerofilní travinná společenstva, lesní lemy a světliny, lesostepní a keřnaté porosty, ovocné sady, okraje vinic, náspy, lomy a travnaté lemy komunikací. Častěji na těžších půdách různé hloubky, slabě kyselých až mírně alkalických, často vápnitých, bohatých na živiny, ale chudých na dusík, suchých až svěžích, v létě vysychavých, v polohách slunných až polostinných.

V ČR se vyskytuje od nížin až do podhůří roztroušeně až hojně, ale v řadě vlhčích a chladnějších území vzácně či chybí; v horách se vyskytuje zavlečen výjimečně a patrně i přechodně se štěrkem podél komunikací.

Na území ČR se vyskytují i jiné druhy řepíku, z nichž nejhojnější je řepík vonný (*Agrimonia procera*), který ale není oficinální. (3)

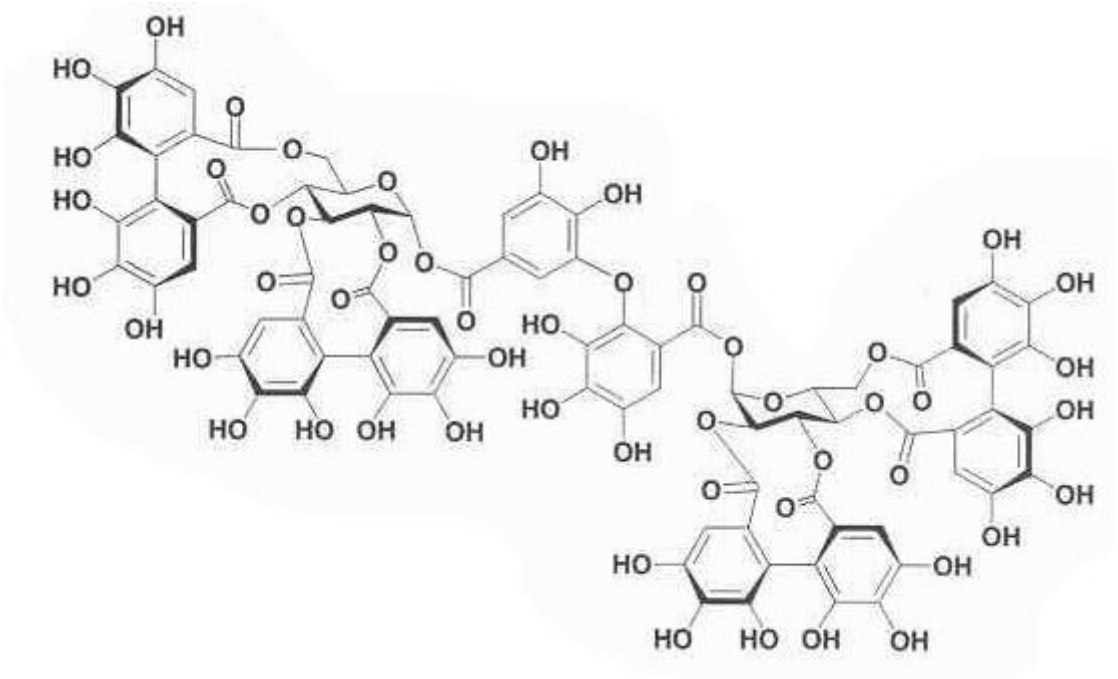
5.3. Obsahové látky

5.3.1. Flavonoidy

Hyperosid, kvercetin-3´-O-β-D-glukopyranosid, kvercitrin, kempferol, kempferol-3-rhamnosid, kempferol-3-rutinosid, kempferol-3-glukosid, kempferol-3-O-α-L-rhamnopyranosid (afzelin), kempferid, kempferid-3-rhamnosid, luteolin-7-O-soforosid, luteolin-7-O-(6´-acetylglukosid), luteolin-7-O-glukosid, apigenin-7-O-glukosid, akacetin-7-O-glukosid. (6)

5.3.2. Třísloviny

Pro rod *Agrimonia* (ale také *Fragaria* a *Potentilla*) je typický agrimoniin (viz obr. č.11). Dále se vyskytují následující kyseliny: kyselina salicylová, kyselina p-hydroxybenzoová, kyselina p-hydroxyfenyloctová, kyselina vanilová, kyselina gallová, kyselina syringová, kyselina p-kumarová, kyselina chlorogenová. (6)



Obr. č.11. Agrimoniin

5.3.3. Další látky

Silice, hořčiny, fytoncidní látky působící na různé kmeny mykobakterií, v popelu kyselina křemičitá. (6)

5.4. Použití drogy

Droga se používá v lidovém léčitelství zejména jako adstringens, dále pak jako cholagogum, hemostatikum, slabé diuretikum, antidiarrhoikum, antidiabetikum a také pro své antibakteriální účinky. Bylo též popsáno protinádorové působení methanolického extraktu z drogy.

Droga též vykazuje značné antiradikálové působení (díky obsahu polyfenolů, vyšší antiradikálová aktivita byla popsána u extraktů připravených z drogy polárními rozpouštědly.

Na kočkách bylo pozorováno hypotenzivní působení. (6)

6. POUŽITÉ STANDARDY A JEJICH STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA

6.1. Pyrogalol

Jde o trojsytný fenol (1,2,3-trihydroxybenzen), v lékopise je uveden jako standard pro stanovení tříslovin.

6.2. Kyselina gallová

Jedná se o kyselinu 3,4,5-trihydroxybenzoovou – viz vzorec výše.

6.3. Tannin

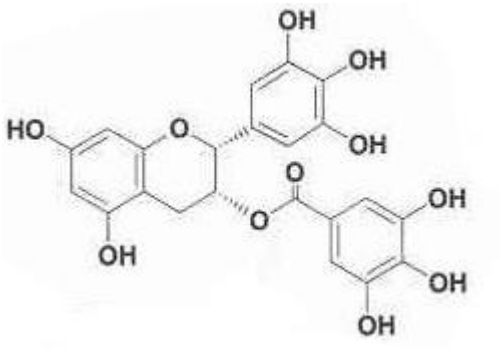
Podle ČL 2002 jde o směs esterů glukózy s kyselinou gallovou a kyselinou 3-galloylgallovou. Je to nažloutle bílý nebo nahnědlý lehký amorfní prášek nebo lesklé šupiny. Je velmi snadno rozpustný ve vodě, snadno v acetonu, 96% ethanolu a 85% glycerolu, prakticky nerozpustný v dichlormethanu. Získává se z duběnek. (2)

6.4. Katechin

Jedná se o kondenzovanou třílovinu, vzorec je uveden v kapitole Kondenzované třísloviny. (1)

6.5. Epigallokatechingallát

Je obsažen z 5 - 12% v listech čajovníku. Jde o ester epigallokatechinu a kyseliny gallové. Vzorec viz obr.12. (1)



Obr. 12. Epigallokatechingallát

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1. Použité přístroje

- UV-VIS Spectrophotometer UV 1601 (Shimadzu – Kyoto, Japan)
- Rotační vakuová odparka Laborota (Fisher Scientific, Germany)
- Třepačka LT 2 (Fisher Scientific, Germany)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex (Bandelin Electronic, Germany)

7.2. Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie byly kvality p.a.

- Aceton
- Difenylboryloxyethylamin (10 g/l) v methanolu
- Ethylacetát
- Kožní prášek CRL
- Kyselina chlorovodíková (250 g/l)
- Kyselina mravenčí bezvodá
- Makrogol 400 (50 g/l) v methanolu
- Methanol
- Methenamin (5 g/l)
- Petrolether
- Pyrogalol
- Síran sodný bezvodý
- Uhličitan sodný (290 g/l)
- Zkoumadlo fosfomolybdenan-wolframové (připraveno podle ČL 2002)

Standardy pro měření antiradikálové aktivity:

- Epigallokatechingallát (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
- Katechin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
- Kyselina gallová (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
- Pyrogalol (Carl RothGmbH, Karlsruhe, Germany)
- Tannin (Lachema)

7.3. Důkaz flavonoidů

Důkaz flavonoidů byl proveden tenkovrstvou chromatografií dle Českého lékopisu 2002, článek Agrimoniae herba.

Zkoušený roztok. 2,0 g práškované drogy byly smíseny s 20 ml methanolu a zahřívány 10 minut při 40°C za protřepávání. Směs byla poté zfiltrována.

Porovnávací roztok. 1,0 mg rutinu a 1,0 mg isokvercitrinu bylo rozpuštěno ve 2 ml methanolu.

Stacionární fáze. Deska s vrstvou silikagelu pro TLC.

Mobilní fáze. Směs objemových dílů kyseliny mravenčí bezvodé, vody a ethylacetátu (10 + 10 + 80).

Nanášení. 10 µl do proužků.

Vyvíjení. Po dráze přesahující 12 cm.

Sušení. Při 100°C až 105°C.

Detekce. Deska byla ještě za tepla postříkána roztokem difenylboryloxyethylaminu (10 g/l) v methanolu a poté ještě roztokem makrogolu 400 (50 g/l) v methanolu. Poté byla ponechána sušit na vzduchu 30 minut a nato pozorována v ultrafialovém světle při 365 nm. Hodnocení viz tabulka 1. (2)

7.4. Stanovení tříslovin

2,0 g práškované drogy byly v 250 ml odměrné baňce s kulatým dnem smíseny se 150 ml vody (aqua purificata) a zahřívány 30 minut na vodní lázni. Poté byla směs ochlazena pod tekoucí vodou a kvantitativně převedena do 250 ml odměrné baňky. Baňka s kulatým dnem byla promyta vodou, promývací tekutina byla poté přidána do odměrné baňky a celá směs byla zředěna vodou na 250,0 ml. Po usazení částic drogy byla tekutina zfiltrována filtračním papírem o průměru 125 mm. Prvních 50 ml filtrátu bylo odstraněno.

Celkové polyfenoly. 5,0 ml filtrátu bylo zředěno vodou na 25,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku bylo smíseno s 1,0 ml zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového, 10,0 ml vody a zředěno roztokem uhličitanu sodného (290 g/l) na 25,0 ml. Po 30 minutách po přidání posledního roztoku byla změřena absorbance při 760 nm (A_1) za použití vody jako kontrolní tekutiny.

Polyfenoly neabsorbovatelné na kožní prášek. K 10,0 ml filtrátu bylo přidáno 0,10 g kožního prášku a směs se nechala intenzivně protřepávat 60 minut. Poté byla směs

zfiltrována. 5,0 ml filtrátu bylo zředěno vodou na 25,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku bylo smícháno s 1,0 ml zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového, 10,0 ml vody a zředěno roztokem uhličitanu sodného (290 g/l) na 25,0 ml. Po 30 minutách od přidání posledního roztoku byla změřena absorbance při 760 nm (A_2) za použití vody jako kontrolní tekutiny.
Porovnávací roztok. 50,0 mg pyrogalolu bylo těsně před použitím rozpuštěno ve vodě a jí zředěno na 100,0 ml. 5,0 ml tohoto roztoku bylo zředěno vodou na 100,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku bylo smíseno s 1,0 ml zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového R, 10,0 ml vody R a zředěno roztokem uhličitanu sodného R (290 g/l) na 25,0 ml. Po 30 minutách od přidání posledního roztoku byla změřena absorbance při 760 nm (A_3) za použití vody R jako kontrolní tekutiny.

Obsah třísloviny v procentech vyjádřený jako pyrogalol byl spočítán podle vzorce:

$$\frac{62{,}5 \cdot (A_1 - A_2) \cdot m_2}{A_3 \cdot m_1}$$

m_1 = hmotnost zkoušené látky v gramech
m_2 = hmotnost pyrogalolu v gramech

Dále pak byla vypočtena *směrodatná odchylka* podle vztahu:

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma(X_i - \overline{X})^2}{n-1}}$$

X_i = měřená hodnota
$\overline{X}$ = aritmetický průměr hodnot X_i
n = počet hodnot X_i
s = směrodatná odchylka

Výsledky uvádí tabulka 2. (2)

7.5. Stanovení flavonoidů

Provedeno dle článku *Betulae folium* v ČL 2002..
Základní roztok: 0,500 g práškované drogy bylo ve 100 ml baňce smícháno s 1 ml roztoku methenaminu R (5 g/l), 20 ml acetonu R a 2,0 ml kyseliny chlorovodíkové RS (250 g/l) a směs se nechala 30 minut povařit pod zpětným chladičem. Poté byla zfiltrována přes

chomáček vaty do 100 ml odměrné baňky. Droga i chomáček vaty byly povařeny ještě dvakrát 10 minut s 20 ml acetonu R pod zpětným chladičem. Po ochlazení byla směs zfiltrována filtračním papírem do téže odměrné baňky. Roztok v odměrné baňce byl zředěn acetonem R předem použitým k promytí baňky a filtru na 100,0 ml. 20,0 ml roztoku bylo převedeno do dělící nálevky, bylo přidáno 20 ml vody R a protřepáváno nejprve 15 ml a pak třikrát 10 ml ethylacetátu R. Spojené horní vrstvy byly protřepávány dvakrát 50 ml vody R a zfiltrovány přes 10 g síranu sodného bezvodého R do 50 ml odměrné baňky. Roztok v baňce byl zředěn ethylacetátem R na 50,0 ml.

Zkoušený roztok. 10,0 ml základního roztoku bylo smícháno s 1,0 ml roztoku chloridu hlinitého RS1 (2,0 g hexahydrátu chloridu hlinitého ve 100 ml roztoku kyseliny octové ledové R 5% v/v) a zředěno roztokem kyseliny octové ledové R 5% v/v v methanolu R na 25,0 ml.

Kontrolní roztok. 10,0 ml základního roztoku bylo zředěno roztokem kyseliny octové ledové R 5% v/v v methanolu R na 25,0 ml.

Po 30 minutách byla změřena absorbance zkoušeného roztoku při 425 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid ($C_{21}H_{20}O_{12}$) byl spočítán podle vzorce:

$$(A \cdot 1{,}25) / m$$

A = absorbance roztoku při 425 nm

M = hmotnost drogy v gramech

Specifická absorbance hyperosidu má hodnotu 500. (2)

Dále byla spočtena směrodatná odchylka pomocí vztahu uvedeného výše – viz *kapitola 6.5 Stanovení třísloviny*.

Výsledky uvádí tabulka č.3.

7.6. Měření antiradikálové aktivity

Do 5,0 ml odměrných baněk bylo postupně odměřeno 0,25 ml, 0,5 ml, 0,75 ml, 1,0 ml, 1,25 ml, 1,5 ml, 1,75 ml a 2,0 ml vzorku. Poté bylo do každé baňky přidáno 0,2 ml roztoku DPPH a doplněno methanolem na 5,0 ml (po rysku). Baňky byly poté umístěny do

temna a po 30 minutách byla změřena absorbance (A_{vz}) jejich obsahu proti methanolu. V každém dni měření se provedla jedna slepá zkouška – do 5,0 ml odměrné baňky bylo odměřeno 0,2 ml DPPH a doplněno methanolem na 5,0 ml, po 30 minutách v temnu byla změřena absorbance (A_{sl}) tohoto kontrolního roztoku.

Antiradikálová aktivita v procentech (AA) byla vypočtena podle vztahu:

$$AA = (1- A_{vz}/A_{sl}) \cdot 100$$

AA = antiradikálová aktivita vzorku (%)
A_{vz} = absorbance měřeného roztoku
A_{sl} = absorbance kontrolního roztoku

Výsledky uvádí tabulky 4 až 12 a grafy 1 až 9. Z grafů byla spočtena hodnota IC_{50} udávající, kolik μg látky ve vzorku obsažené bylo potřeba k eliminaci 50% přítomného radikálu.

7.6.1. Antiradikálová aktivita methanolového extraktu drogy připraveného za tepla

Příprava vzorku:

1,9992 g drogy bylo smícháno v 250 ml varné baňce s přibližně 50 ml methanolu a vařeno pod zpětným chladičem na vodní lázni 10 minut. Poté byla směs ochlazena, zfiltrována do 100,0 ml odměrné baňky a doplněna methanolem na 100,0 ml.
1,0 ml tohoto roztoku bylo převedeno do další 100,0 ml odměrné baňky a doplněno methanolem na 100,0 ml.

S tímto roztokem bylo postupováno podle kapitoly 4.1. Výsledky uvádí tabulka 4 a graf 1.

7.6.2. Antiradikálová aktivita methanolového extraktu drogy připraveného za studena

Příprava vzorku:

2,0101 g drogy bylo smíseno s přibližně 50 ml methanolu a vloženo do ultrazvukové lázně na dobu 15 minut. Po zfiltrování do 100,0 ml odměrné baňky bylo

doplněno methanolem po rysku, poté 1 ml tohoto roztoku byl převeden do další 100 ml odměrné baňky a doplněn methanolem po rysku.

Antiradikálová aktivita byla měřena postupem uvedeným výše. Výsledky uvádí tabulka 5 a graf 2.

7.6.3. Antiradikálová aktivita methanolového extraktu připraveného za tepla po odstranění chlorofylu

Methanolový extrakt drogy připravený za tepla z 2,0296 g drogy byl vytřepáván petroletherem a methanolová frakce byla odpařena do sucha. Odparek byl smísen s malým množstvím methanolu a kvantitativně převeden do 25,0 ml odměrné baňky, doplněn methanolem na 25,0 ml, poté byl převeden 1,0 ml tohoto roztoku do další 25,0 ml odměrné baňky a doplněn methanolem na 25,0 ml, poté bylo 2,5 ml tohoto posledního roztoku převedeno do 25,0 ml odměrné baňky a doplněno na 25,0 ml methanolem.

Poté byla měřena antiradikálová aktivita postupem uvedeným výše. Výsledky uvádí tabulka 6 a graf 3.

7.6.4. Antiradikálová aktivita lyofilizovaného vodného výluhu drogy.

Příprava vzorku:

5,1010 g drogy bylo přelito 500 ml horké vody, bylo ponecháno 30 minut stát, poté zfiltrováno, doplněno vodou na objem 500,0 ml, výluh byl rozdělen do tří Petriho misek, zmrazen v mraznici (Calex) a poté lyofilizován. Získáno takto bylo 1,0446 g lyofilizátu. Bylo odváženo 0,1022 g lyofilizátu a v 25,0 ml odměrné baňce, doplněno methanolem na 25 ml, po zfiltrování byl 1,0 ml filtrátu převeden do 100,0 ml odměrné baňky a doplněn na 100,0 ml.

Stanovení antiradikálové aktivity bylo provedeno postupem popsaným výše, výsledky uvádí tabulka 7 a graf 4.

7.6.5. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku kyseliny gallové

1,0301 g kyseliny gallové bylo převedeno do 100,0 ml odměrné baňky a doplněno methanolem po rysku, poté byl 1,0 ml tohoto roztoku převeden do další 100,0 ml odměrné

baňky a doplněn po rysku a poté byly 2,0 ml tohoto roztoku převedeny do 50,0 ml odměrné baňky a doplněny methanolem po rysku.

Antiradikálová aktivita byla stanovena postupem popsaným výše, výsledky uvádí tabulka 8 a graf 5.

7.6.6. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku pyrogalolu

0,6071 g pyrogalolu bylo převedeno do 50,0 ml odměrné baňky a doplněno methanolem po rysku. 1,0 ml tohoto roztoku byl převeden do 100,0 ml odměrné baňky a doplněn methanolem po rysku, poté byly 2,0 ml tohoto zředěného roztoku převedeny do 50,0 ml odměrné baňky a methanolem doplněny po rysku.

Antiradikálová aktivita tohoto roztoku byla změřena postupem popsaným výše, výsledky uvádí tabulka 9 a graf 6.

7.6.7. Antiradikálová aktivita methanolického roztoku tanninu

0,5038 g tanninu bylo převedeno do 50,0 ml odměrné baňky a doplněno po rysku methanolem, poté byl 1,0 ml tohoto roztoku převeden do 100,0 ml odměrné baňky a doplněn methanolem po rysku, poté byly 2,0 ml tohoto roztoku převedeny do 50,0 ml odměrné baňky a doplněny methanolem po rysku.

Antiradikálová aktivita tohoto roztoku byla připravena způsobem popsaným výše, výsledky uvádí tabulka 10 a graf 7.

7.6.8. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku epigalokatechin-gallátu

0,0101 g epigalokatechingallátu bylo převedeno do 100,0 ml odměrné baňky a doplněno methanolem po rysku a poté bylo 10,0 ml tohoto roztoku převedeno do 50,0 ml odměrné baňky a doplněno methanolem po rysku.

Antiradikálová aktivita tohoto roztoku byla stanovena postupem popsaným výše, výsledky uvádí tabulka 11 a graf 8.

7.6.9 Antiradikálová aktivita methanolového roztoku katechinu

0,4998 g katechinu bylo převedeno do 50,0 ml odměrné baňky a doplněno po rysku methanolem, poté byl 1,0 ml tohoto roztoku převeden do 100,0 ml odměrné baňky a doplněn methanolem po rysku, poté byly 2,0 ml tohoto roztoku převedeny do 50,0 ml odměrné baňky a doplněny methanolem po rysku.

Výsledky měření antiradikálové aktivity uvádí tabulka č.12 a graf č.9.

8. VÝSLEDKY

8.1. Důkaz flavonoidů

Tabulka č.1: Důkaz flavonoidů pomocí tenkovrstvé chromatografie

Horní okraj desky	
Isokvercitrin: oranžově fluoreskující skvrna	Oranžově fluoreskující skvrna (isokvercitrin) Oranžově fluoreskující skvrna (hyperosid)
Rutin: oranžově fluoreskující skvrna	Oranžově fluoreskující skvrna (rutin)
Porovnávací roztok	**Zkoušený roztok**

8.2. Stanovení tříslovin

Navážka pyrogalolu: 0,0550

Tabulka č.2: Stanovení obsahu tříslovin v droze (vyjádřeno v % pyrogalolu)

Navážka (g)	**A_1**	**A_2**	**A_3**	**Obsah tříslovin (%)**	**Průměrný obsah tříslovin (%)**
1,0239	0,881	0,228	0,4155	5,2763	5,1348 ± 0,3308
1,0366	0,804	0,208		4,7567	
1,0335	0,876	0,205		5,3713	

8.3. Stanovení flavonoidů

Tabulka č.3: Stanovení obsahu flavonoidů v droze (vyjádřeno v % hyperosidu)

Navážka (g)	**Absorbance**	**Obsah flavonoidů (%)**	**Průměrný obsah flavonoidů (%)**
0,5227	0,238	0,5692	0,5544 ± 0,0134
0,5036	0,222	0,5510	
0,4995	0,217	0,5430	

8.4. Měření antiradikálové aktivity

8.4.1. Antiradikálová aktivita methanolového extraktu připraveného za tepla

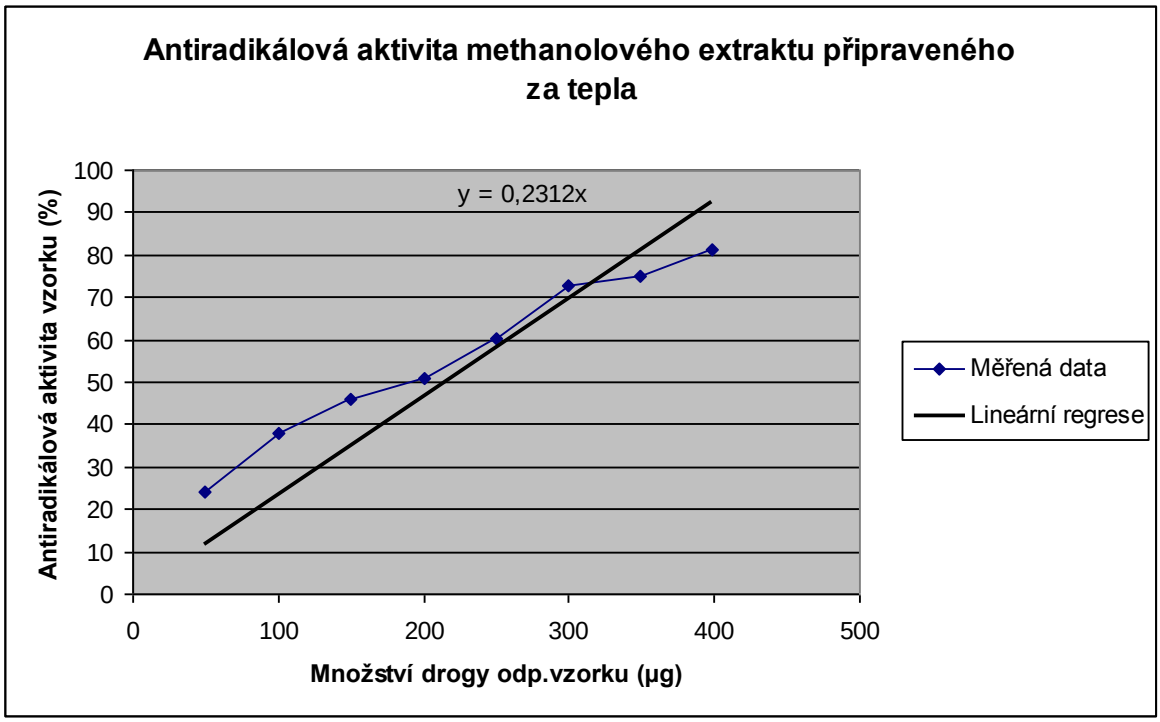
Tabulka č.4: Antiradikálová aktivita extraktu:

Navážka drogy: 1,9992 g

Absorbance kontrolního roztoku: 0,789

Objem vzorku (ml)	Množství drogy odp.vzorku (µg)	Absorbance vzorku	Antiradikálová aktivita vzorku (%)
0,25	49,98	0,598	24,21
0,5	99,96	0,491	37,77
0,75	149,94	0,426	46,01
1,0	199,92	0,388	50,82
1,25	249,90	0,315	60,08
1,5	298,88	0,216	72,62
1,75	348,86	0,198	74,90
2,0	398,84	0,147	81,37

Graf č.1:



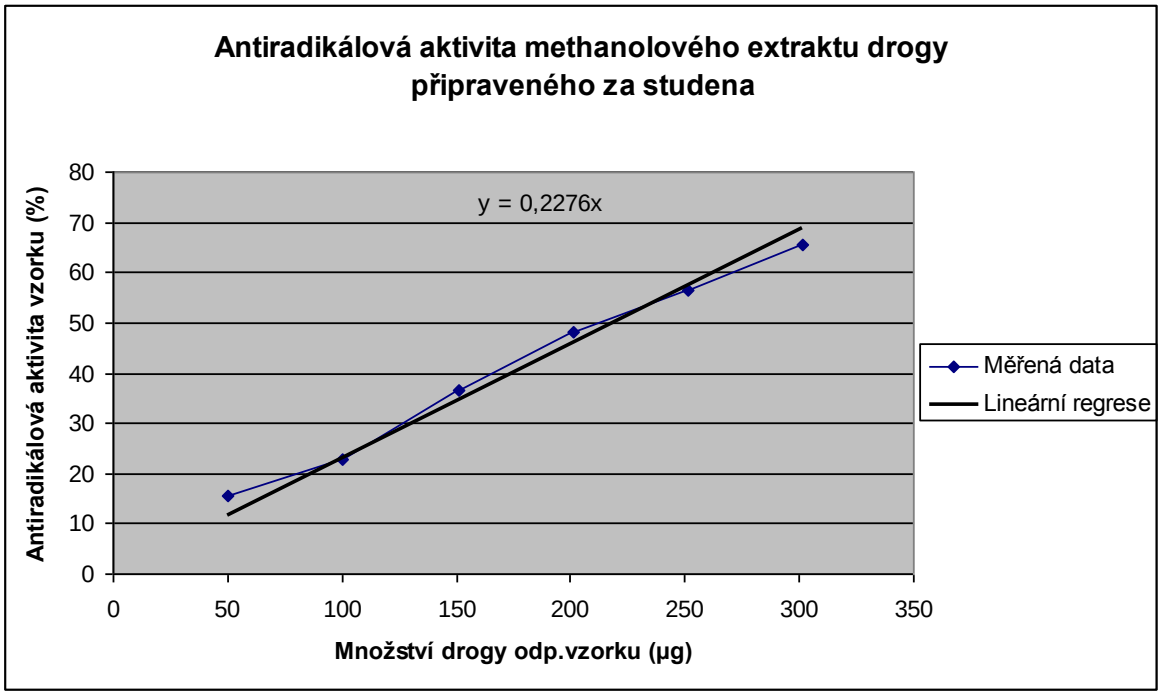
8.4.2. Antiradikálová aktivita methanolového extraktu drogy připraveného za studena

Tabulka č.5: Antiradikálová aktivita extraktu

Absorbance kontrolního roztoku: 0,760

Objem vzorku (ml)	Množství drogy odp.vzorku (µg)	Absorbance vzorku	Antiradikálová aktivita vzorku (%)
0,25	50,25	0,642	15,53
0,5	100,50	0,586	22,83
0,75	150,75	0,481	36,64
1,0	201,01	0,393	48,29
1,25	251,26	0,330	56,58
1,5	301,51	0,261	65,59
1,75	351,77	0,199	73,88
2,0	402,02	0,160	78,95

Graf č.2:



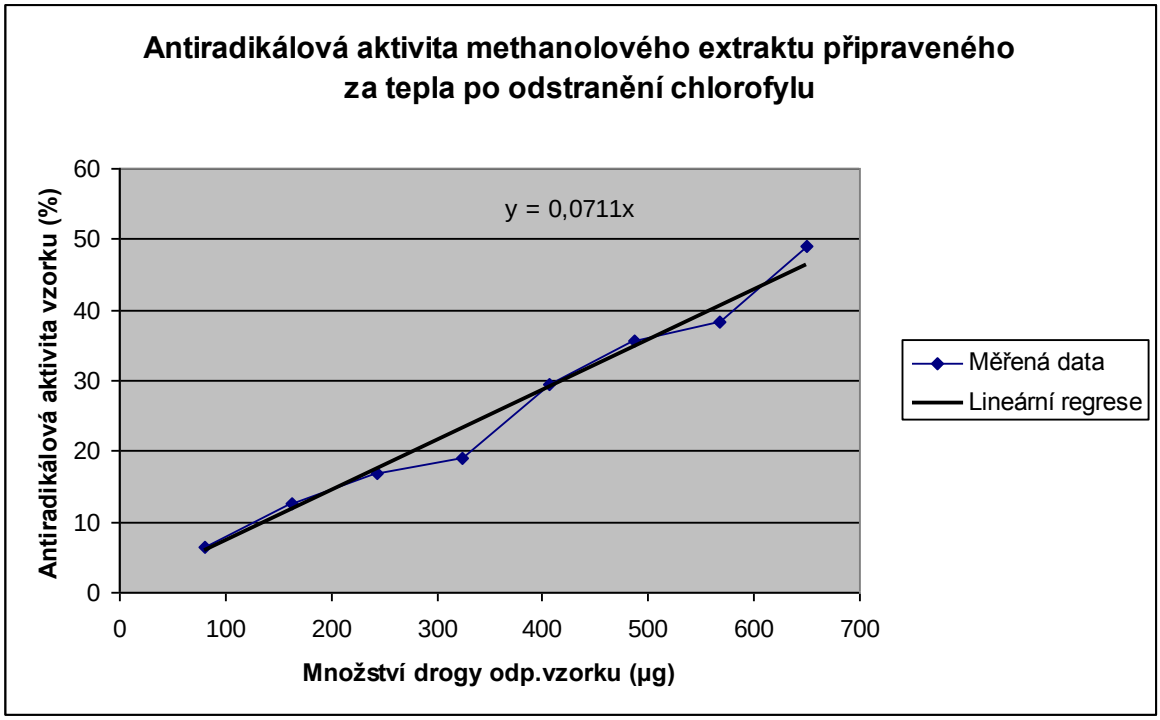
8.4.3. Antiradikálová aktivita methanolového extraktu připraveného za tepla po odstranění chlorofylu

Tabulka č.6: Antiradikálová aktivita extraktu

Absorbance kontrolního vzorku: 0,985

Objem vzorku (ml)	Množství drogy odp.vzorku (µg)	Absorbance vzorku	Antiradikálová aktivita vzorku (%)
0,25	81,18	0,922	6,40
0,5	162,37	0,862	12,49
0,75	243,55	0,819	16,85
1,0	324,73	0,798	18,98
1,25	405,91	0,695	29,44
1,5	487,10	0,635	35,53
1,75	568,28	0,607	38,38
2,0	649,46	0,503	48,93

Graf č.3:



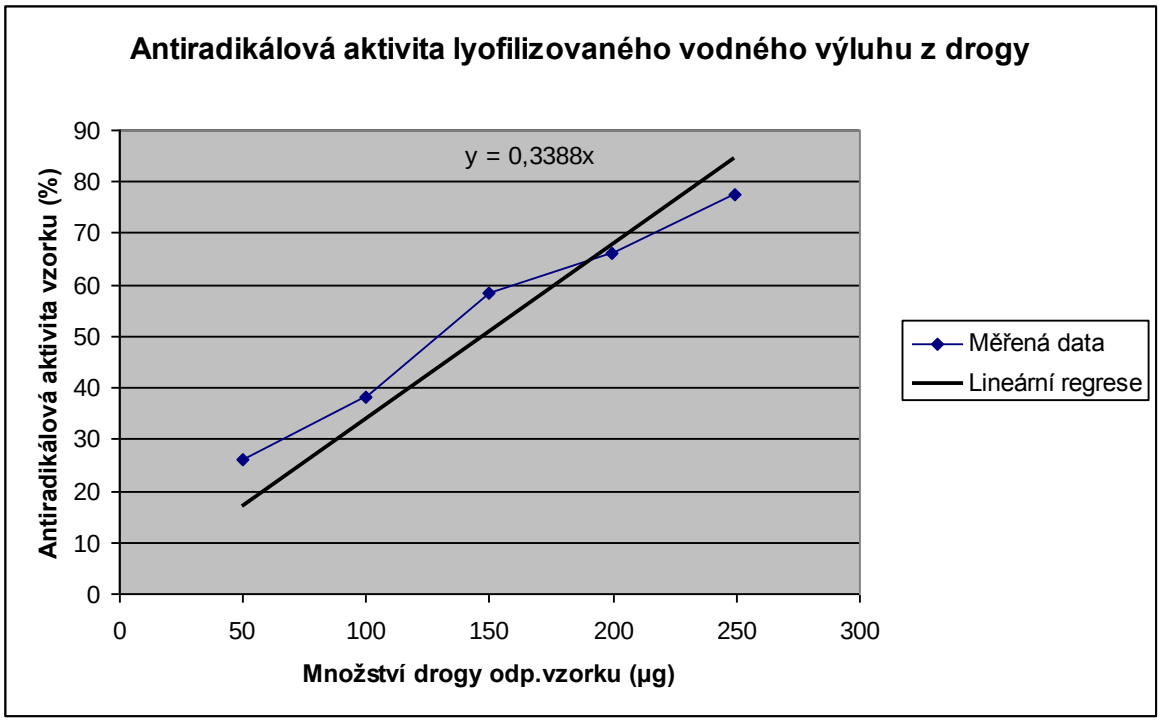
8.4.4. Antiradikálová aktivita lyofilizovaného vodného výluhu z drogy

Tabulka č.7: Antiradikálová aktivita extraktu

A_{sl} = 0,934

Objem vzorku (ml)	Množství lyofilizátu odp.vzorku (µg)	Odpovídající množství drogy (µg)	Absorbance vzorku	Antiradikálová aktivita vzorku (%)
0,25	10,22	49,91	0,690	26,12
0,5	20,44	99,82	0,578	38,06
0,75	30,66	149,72	0,388	58,51
1,0	40,88	199,63	0,315	66,22
1,25	51,10	249,54	0,211	77,46
1,5	61,32	299,45	0,151	83,78
1,75	71,54	349,35	0,121	87,10
2,0	81,76	399,26	0,111	88,12

Graf č.4:



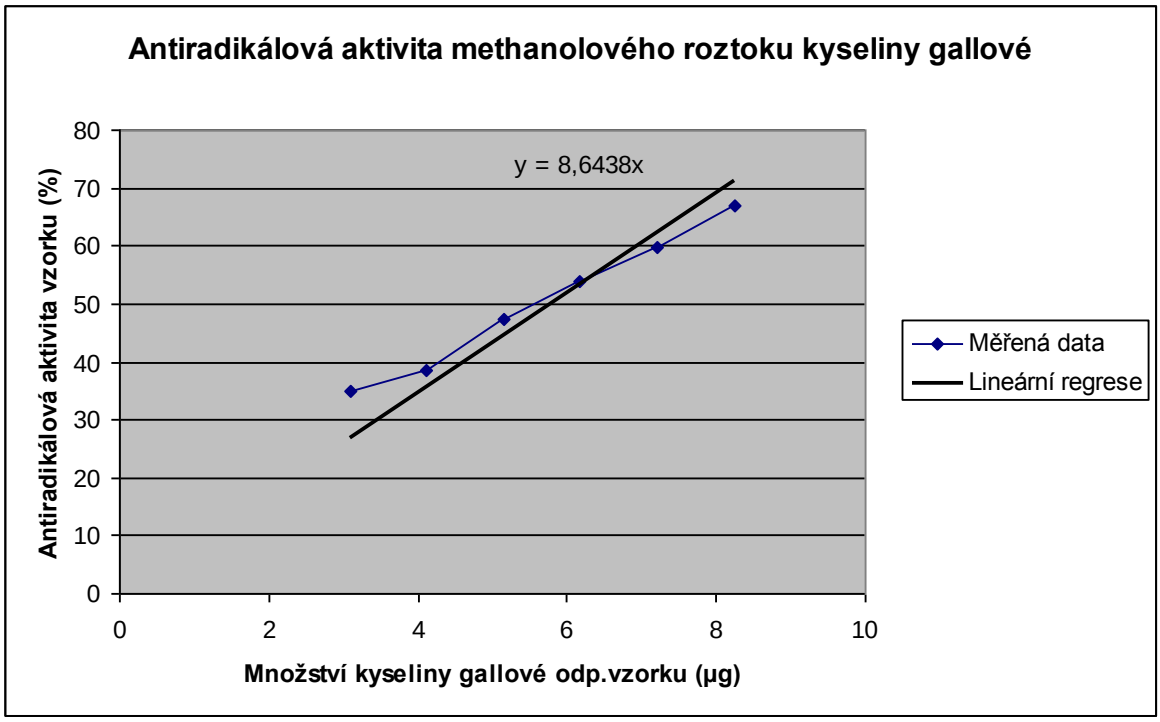
8.4.5. Antiradikálové aktivita methanolového roztoku kyseliny gallové

Tabulka č.8: Antiradikálová aktivita roztoku

A_{sl} = 0,934

Objem vzorku (ml)	Množství kyseliny gallové odp.vzorku (µg)	Absorbance vzorku	Antiradikálová aktivita vzorku (%)
0,25	1,03	0,651	30,30
0,5	2,06	0,628	32,76
0,75	3,09	0,607	35,01
1,0	4,12	0,574	38,54
1,25	5,15	0,493	47,22
1,5	6,18	0,430	53,96
1,75	7,21	0,376	59,74
2,0	8,24	0,310	66,81

Graf č.5:



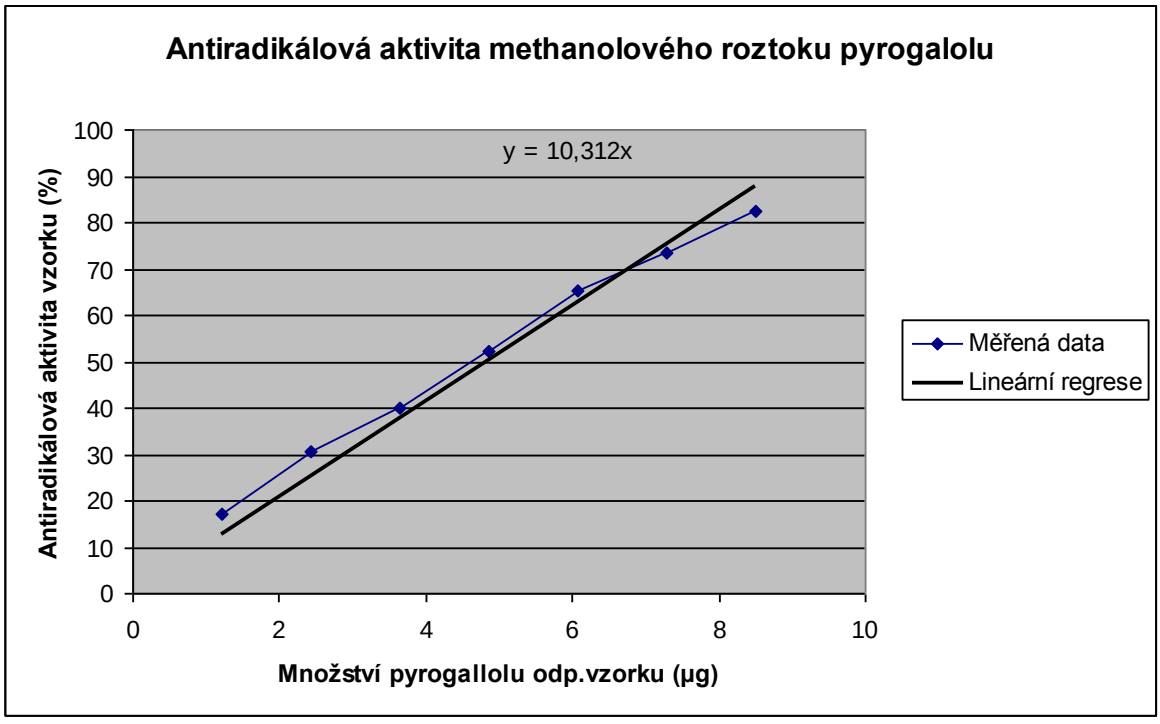
8.4.6. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku pyrogalolu

Tabulka č.9: Antiradikálová aktivita roztoku

A_{sl} = 1,005

Objem vzorku (ml)	Množství pyrogalolu odp.vzorku (µg)	Absorbance vzorku	Antiradikálová aktivita vzorku (%)
0,25	1,21	0,831	17,31
0,5	2,43	0,699	30,45
0,75	3,64	0,604	39,90
1,0	4,86	0,479	52,34
1,25	6,07	0,347	65,47
1,5	7,29	0,266	73,53
1,75	8,50	0,176	82,49
2,0	9,71	0,127	87,36

Graf č.6:



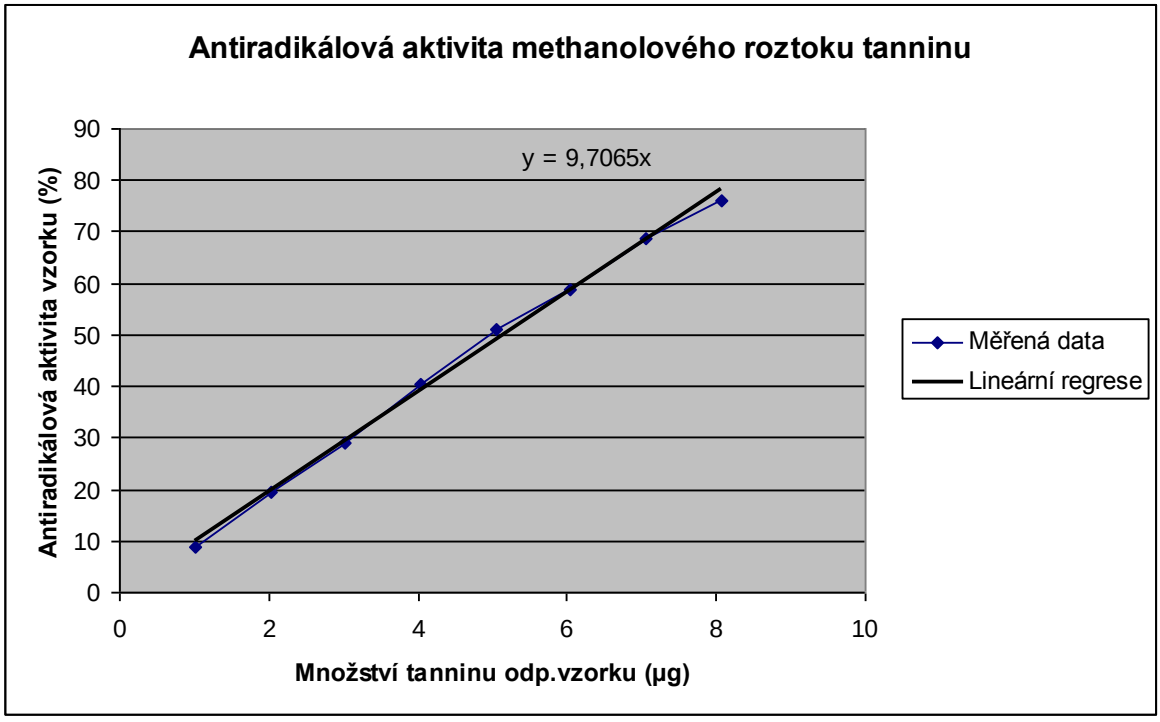
8.4.7. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku tanninu

Tabulka č.10: Antiradikálová aktivita roztoku

A_{sl} = 0,959

Objem vzorku (ml)	Množství tanninu odp.vzorku (µg)	Absorbance vzorku	Antiradikálová aktivita vzorku (%)
0,25	1,01	0,876	8,65
0,5	2,02	0,774	19,29
0,75	3,02	0,681	28,99
1,0	4,03	0,572	40,35
1,25	5,04	0,469	51,09
1,5	6,05	0,394	58,92
1,75	7,05	0,299	68,82
2,0	8,06	0,229	76,12

Graf č.7:



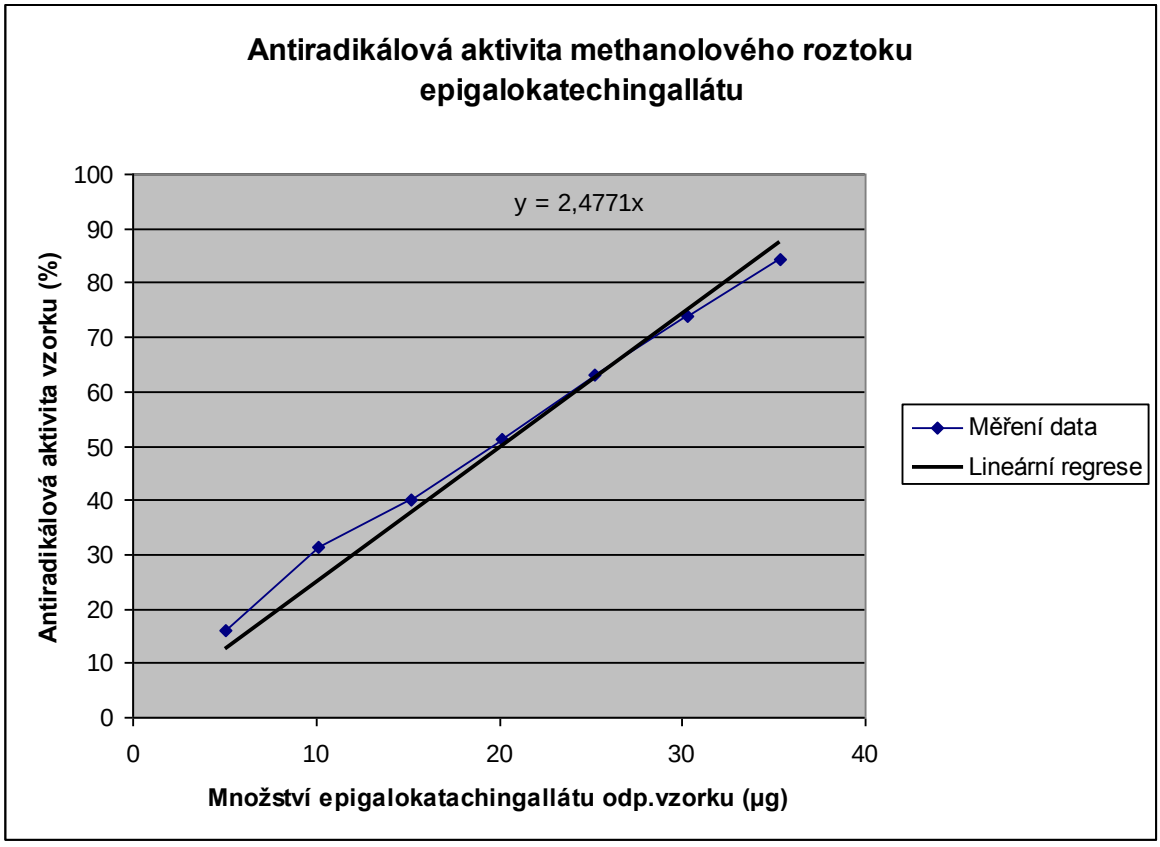
8.4.8. Antiradikálová aktivita methanolového roztoku epigalokatechin-gallátu

Tabulka č.11: Antiradikálová aktivita roztoku

A_{sl} = 0,959

Objem vzorku (ml)	Množství epigalokatechin-gallátu odp.vzorku (µg)	Absorbance vzorku	Antiradikálová aktivita vzorku (%)
0,25	5,05	0,804	16,16
0,5	10,10	0,657	31,49
0,75	15,15	0,574	40,15
1,0	20,20	0,468	51,20
1,25	25,25	0,355	62,98
1,5	30,30	0,251	73,83
1,75	35,35	0,152	84,15
2,0	40,40	0,114	88,11

Graf č.8:



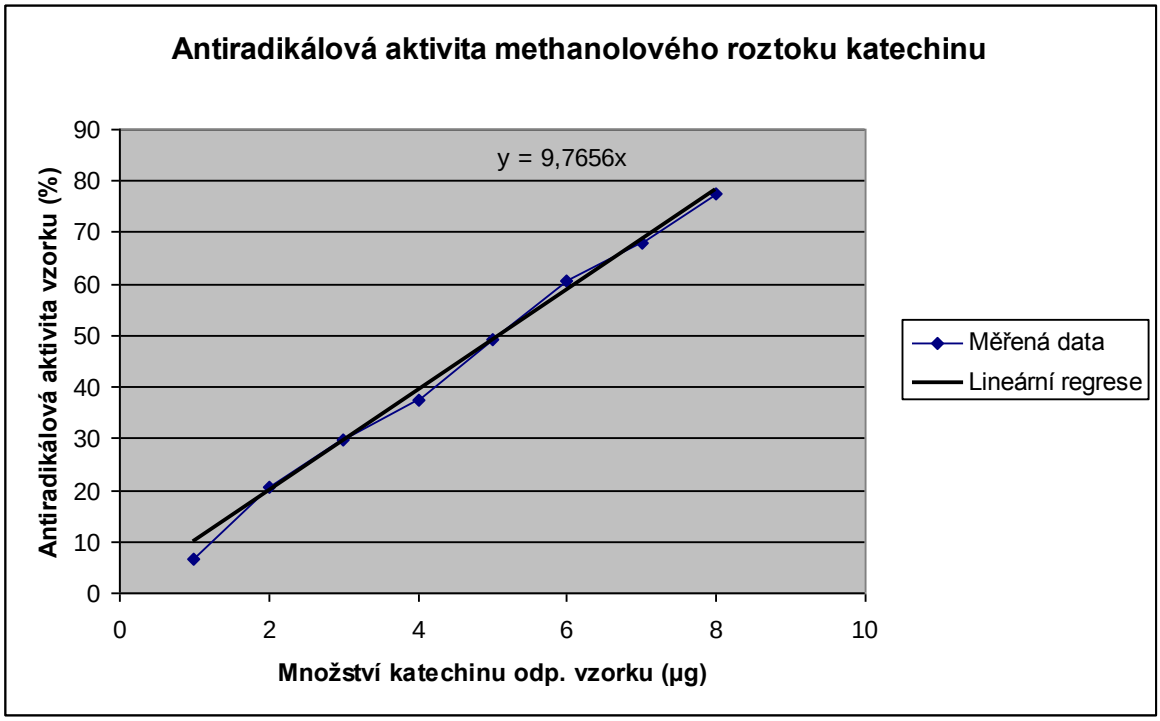
8.4.9. Měření antiradikálové aktivity methanolového roztoku katechinu

Tabulka č.12: Antiradikálová aktivita roztoku

A_{sl} = 0,959

Objem vzorku (ml)	Množství katechinu odp. vzorku (µg)	Absorbance vzorku	Antiradikálová aktivita vzorku (%)
0,25	1,00	0,895	6,67
0,5	2,00	0,762	20,54
0,75	3,00	0,675	29,61
1,0	4,00	0,600	37,43
1,25	5,00	0,488	49,11
1,5	6,00	0,376	60,79
1,75	7,00	0,306	68,09
2,0	8,00	0,217	77,37

Graf č.9:



9. DISKUSE

V moderní společnosti stoupá počet civilizačních onemocnění, která souvisí s působením volných radikálů. Vzrůstá tedy snaha chránit organismus před těmito radikály. Ke zmírnění jejich vlivu může přispívat vyšší příjem exogenních antioxidantů, proto vzrůstá tendence hodnotit antioxidační vlastnosti čistých přírodních látek, rostlinných extraktů a potravinových doplňků. (7)

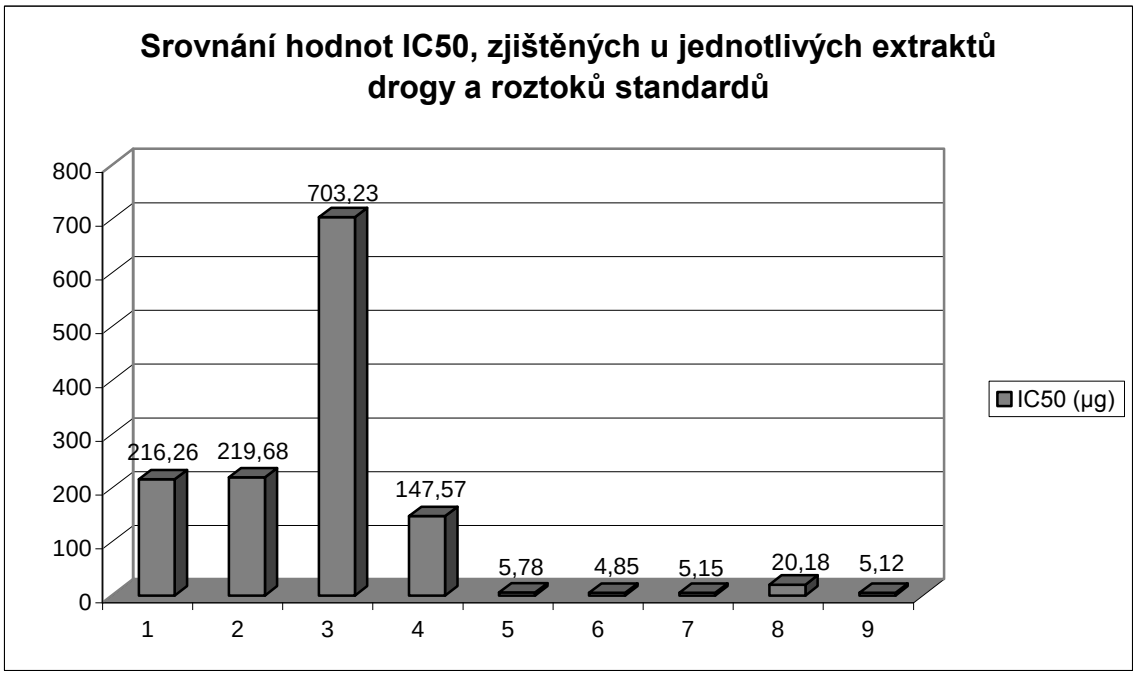
Drogy s obsahem tříslovin mají obsahové látky dosud jen částečně prozkoumané, zejména struktura tříslovin je podrobněji objasňována teprve v posledních letech. Třísloviné drogy se tradičně používají jako adstringencia vnitřně i zevně, dále pak jako antidiarrhoika a také jako antifungální a antibakterilní látky.

Údaje, zjištěné pomocí různých metod stanovení antiradikálové aktivity, nemají však charakter úplné informace o celkové antioxidační aktivitě komplexně vyhodnocující účinek látky v organismu. Je třeba také vzít v úvahu skutečnost, že antioxidanty přijímané potravou mohou působit buď přímo v gastrointestinálním traktu, nebo mohou být resorbovány do organismu. Při jejich resorpci a následném metabolismu v játrech a dalších tkáních dochází k jejich přeměnám na metabolity, jejichž antioxidační účinek může být odlišný. Souběžně s testováním antioxidační aktivity přírodních látek a jejich směsí *in vitro* je proto třeba věnovat pozornost hodnocení antioxidačního stavu organismu *in vivo* po jejich podání. (7)

Ve své diplomové práci jsem se zaměřil na zjišťování schopnosti extraktů z drogy Agrimoniae herba zhášet radikál DPPH. Hodnoceny byly methanolové výluhy připravené za tepla před i po odstranění chlorofylu, za studena pomocí ultrazvuku, a nakonec lyofilizovaný vodný výluh drogy. Pro srovnání byla změřena též antiradikálová aktivita vybraných standardů – pyrogalolu, kyseliny gallové, katechinu, tanninu a epigallokatechingallátu.

Výsledek ukazuje graf č.10.

Graf č.10:



1. IC_{50} methanolového extraktu drogy připraveného za tepla
2. IC_{50} methanolového extraktu drogy připraveného za studena
3. IC_{50} methanolového extraktu drogy připraveného za tepla po odstranění chlorofylu
4. IC_{50} lyofilizovaného vodného výluhu drogy
5. IC_{50} methanolového roztoku kyseliny gallové
6. IC_{50} methanolového roztoku pyrogalolu
7. IC_{50} methanolového roztoku tanninu
8. IC_{50} methanolového roztoku epigallokatechingallátu
9. IC_{50} methanolového roztoku katechinu

Z hodnocených výluhů se podle mnou provedených analýz ukázal jako nejúčinnější lyofilizovaný vodný výluh z drogy (IC_{50} = 147,57 µg), který byl připraven pomocí postupu jako u čajového nálevu. Tímto postupem přechází do extraktu pravděpodobně nejvíce polyfenolů obsažených v droze. Antiradikálová aktivita tohoto extraktu je přibližně 1,5x vyšší než u extraktů methanolových a přibližně 28x až 30x nižší než u katechinu, tanninu, pyrogalolu a kyseliny gallové.

Dále se ukázalo, že po odstranění chlorofylu antiradikálová aktivita výluhu dosti značně poklesla (oproti původnímu methanolickému výluhu přibližně 3,5x), z čehož vyplývá, že za antiradikálovou aktivitu drogy je chlorofyl zčásti zodpovědný. Extrakce

provedená za tepla a za pokojové teploty neovlivnila přechod antioxidačních látek obsažených v droze do extraktu; antiradikálová aktivita obou těchto extraktů se jevila jako přibližně stejná (viz graf č.10).

Dle chemické struktury by epigallokatechingallát měl vykazovat vyšší antiradikálovou aktivitu než tannin či katechin (obsahuje totiž více volných hydroxylových skupin); příčinou toho, že tato jeho vlastnost v této práci potvrzena není (jeho antioxidační aktivita se jeví asi 4x nižší než u ostatních standardů), může být například v použité metodě. Je známo, že se tato látka osvědčila například při bránění peroxidaci lipidů.

Antiradikálovou aktivitou obsahových látek nadzemních částí druhů *Agrimonia eupatoria* a *Agrimonia procera* se zabývali v roce 2006 ve své studii Venskutonis a kol. K jejímu změření použili metody využívající DPPH a ABTS. Antiradikálová aktivita extraktů z drogy kolísala širokém rozmezí v závislosti na polaritě rozpouštědla použitého k získání extraktu. Výluhy získané pomocí polárnějších rozpouštědel vykazovaly vyšší hodnoty antiradikálové aktivity, vůbec její nejvyšší hodnotu vykazoval acetonový výluh a extrakty připravené z něj za pomoci n-butanolu a vody. (4)

10. ZÁVĚR

V droze Agrimoniae herba byl stanoven obsah tříslovin a flavonoidů. Droga obsahovala 5,13 % tříslovin (vyjádřeno jako pyrogalol) a 0,55 % flavonoidů (vyjádřeno jako kvercetin). U extraktů nati připravených různým postupem byla zjišťována aktivita vůči radikálu DPPH.

Z hodnocených výluhů se jako nejúčinnějších ukázal lyofilizovaný vodný extrakt z drogy (IC_{50} = 147,57 μg). Antiradikálová aktivita tohoto extraktu je přibližně 1,5x vyšší než u extraktů methanolových a přibližně 28x až 30x nižší než u katechinu, tanninu, pyrogalolu a kyseliny gallové.

Odstranění chlorofylu z etanolových extraktů vedlo k poklesu antiradikálové aktivity (přibližně 3,5x), z čehož vyplývá, že za antiradikálovou aktivitu drogy je zčásti zodpovědný též chlorofyl. Podmínky extrakce (teplota) neovlivnily přechod antioxidačních látek obsažených v droze do extraktu.

Antiradikálová aktivita vůči DPPH vyjádřena jako IC_{50} klesala v pořadí pyrogalol – katechin – tannin – kyselina gallová – epigallokatechingallát – lyofilizovaný vodný extrakt drogy – methanolový extrakt drogy připravený za tepla – methanolový extrakt drogy připravený za studena – methanolový extrakt připravený za tepla zbavený chlorofylu.

11. LITERATURA

1. Bruneton, J.: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants. Intercept Ltd., 2nd edition, Londres, Paris, New York 1999
2. Český lékopis 2002. Grada Publishing, Praha 2002
3. Slavík, B.(ed.): Květena České republiky, Academia, Praha 1995, 234 - 236
4. Venskutonis, P.R. et al.: Fitoterapia 2007, 78, 166 – 168
5. Bilia, A.R et al.: Phytochemistry 1993, 32, 1078 – 1079
6. Shabana, M.H. et al.: Herba Polonica 2003, 49, 24 – 28
7. Paulová, H.; Bochořáková, H.; Táborská, E.: Chemické listy 2004, 98, 174 – 179,
8. Tomko, J. a kol.: Farmakognózia, Osveta, Martin 1989
9. Srinivasan P. ET AL.: Life Science 2007, 80, 1080 - 1086
10. Kasdallah-Grissa, A. et al.: Life Sciences 2007, 80, 1033 – 1039
11. Okuda, T.: Phytochemistry 2005, 66, 2012 - 2031