

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Analýza obsahových látek květů *Acer platanoides* L.

Analysis of compounds from flowers *Acer platanoides* L.

Školitel: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

Děkuji PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a rady při tvorbě této práce a také kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření dobrých podmínek pro práci a přátelského prostředí. Děkuji paní Ireně Rejlové za provedení HPLC analýzy a Ing. Kateřině Macákové za pomoc při měření antioxidační aktivity.

OBSAH

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE	9
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1 Botanická charakteristika.....	10
2.1.1 Charakteristika čeledi <i>Aceraceae</i>	10
2.1.2 Charakteristika rodu <i>Acer</i>	10
2.1.3 Charakteristika druhu <i>Acer platanoides</i> L.....	10
2.2 Obsahové látky a využití zástupců čeledi <i>Aceraceae</i>.....	12
2.3 Biologická aktivita obsahových látek rostlin čeledi <i>Aceraceae</i>.....	19
2.3.1 Vazorelaxační účinky	19
2.3.2 Antioxidační a antiradikálová aktivita.....	19
2.3.3 Protinádorová aktivita.....	21
2.3.4 Hepatoprotektivní aktivita	22
2.3.5 Inhibice α -glukosidázy	22
2.3.6 Inhibice β -hexaminidázy (antialergické účinky)	23
2.4 Použité metody.....	23
2.4.1 Měření antioxidační aktivity-úvod	23
2.4.2 Metody stanovení antioxidační aktivity	26
2.4.2.1 Metoda sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu (SIA)	27
2.5 Stanovení celkového obsahu fenolických látek - Folin-Ciocalteuova metoda	28
2.6 Separační metody.....	29
2.6.1 Extrakce	29
2.6.2 Chromatografie	29
2.6.2.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	30
2.6.2.2 Kolonová chromatografie.....	31
2.6.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	31

2.6.3	Filtrace	32
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY.....	33
3.1	<i>Všeobecné postupy</i>	33
3.1.1	Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	33
3.1.2	Odpařování rozpouštědel tekutých extraktů	33
3.1.3	Příprava Sephadexu pro sloupcovou chromatografii.....	33
3.1.4	Sloupcová chromatografie	33
3.2	<i>Potřeby</i>.....	33
3.2.1	Rozpouštědla	33
3.2.2	Chemikálie.....	34
3.2.3	Standardy	34
3.2.4	Detekční činidla	35
3.2.5	Chromatografické adsorbenty.....	36
3.2.6	Vyvíjecí soustavy pro chromatografii	36
3.2.7	Přístroje.....	36
3.3	<i>Testovaný materiál</i>.....	36
3.4	<i>Izolace obsahových látek</i>	36
3.4.1	Extrakce květů <i>Acer platanoides</i>	36
3.4.2	Provedení tenkovrstvé chromatografie	37
3.4.2.1	<i>Orientační zjištění obsahu redukujících látek pomocí vanilinového činidla.....</i>	<i>37</i>
3.4.2.2	<i>Tenkovrstvá chromatografie – standardy I.</i>	<i>38</i>
3.4.2.3	<i>Tenkovrstvá chromatografie - standardy II.....</i>	<i>42</i>
3.4.2.4	<i>Tenkovrstvá chromatografie – standardy III.....</i>	<i>45</i>
3.4.3	Orientační sloupcová chromatografie ethanolového extraktu <i>Acer platanoides</i> na sloupci Sephadexu	48
3.4.4	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) - prokázání rutinu.....	48
3.4.5	Stanovení celkového obsahu fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuovy metody	51
3.5	<i>Biologická aktivita</i>.....	51

3.5.1	Stanovení antioxidační aktivity	51
3.5.1.1	<i>Metoda sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu.....</i>	<i>51</i>
4	DISKUZE A VÝSLEDKY.....	53
5	SOUHRN.....	57
6	LITERATURA	58

Seznam použitých zkratek

AAPH	2,2'-azobis-(2-amidinopropan) dihydro-chlorid
CM-H ₂ DCFDA	5-(6-)chloromethyl-2',7'-dichlorodihydroflourescein diacetát
Cu ²⁺	Měďnaté ionty
DCF	Dichloroflourescein
DPD	N,N-diethyl-p-phenylendiamin
DPPH	2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl
EGCG	(-)-epigallocatechingallát
FAS	Fatty acid synthase
Fe ²⁺	Železnaté ionty
GAE	Kyselina gallová
GR	Glutathion reduktáza
GSH	Glutathion
GSH-px	Glutathion peroxidáza
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
HDFs	Kultura buněk lidských dermálních fibroblastů
HOCl	Kyselina chlorná
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	Low-density lipoprotein cholesterol
O ₂	Kyslík
R _F	Retenční faktor
RNS	Reactive nitrogen species (Reaktivní dusíkové radikály)
ROS	Reactive oxygen species (Reaktivní kyslíkové radikály)

SIA	Sekvenční injekční analýza
SOD	Superoxiddizmutáza
TBARS	Látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
TNF- α	Tumor necrosis factor- α

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Acer platanoides je strom hojně se vyskytující na našem území. Patří do čeledi *Aceraceae*, jejíž zástupci jsou bohatým zdrojem fenolických látek. Prostudované jsou především javory rostoucí ve východní Asii a Japonsku a javory na severoamerickém kontinentu.

Cílem této práce bylo:

- získat dostupné informace o *Acer platanoides* a o dalších zástupcích čeledi *Aceraceae* (o obsahových látkách a biologických účincích),
- izolovat a dále identifikovat obsahové látky květů *Acer platanoides*,
- stanovit celkový obsah fenolických látek ethanolového extraktu květů *Acer platanoides*,
- testovat biologické účinky ethanolového extraktu květů *Acer platanoides* (měření antioxidační aktivity).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Botanická charakteristika

2.1.1 Charakteristika čeledi *Aceraceae*

Do čeledi *Aceraceae* patří jednodomé někdy dvoudomé opadavé dřeviny vyskytující se převážně v mírném až subtropickém pásu severní polokoule. Listy mají nejčastěji vstřícné, jednoduché či složené. Květy jsou uspořádané ve složených květenstvích. Plodem je dvoudílná křídlatá dvounažka.¹ Patří sem rod *Acer* a rod *Diptenoria* (původem z Číny). Poslední dobou bývá na základě dvoudomosti exemplářů a vzhledem k obsahovým látkám vyčleňován rod *Negundo* (jasanojavor).⁴

2.1.2 Charakteristika rodu *Acer*

Rod *Acer*, vyskytující se převážně na severní polokouli v mírném až subtropickém pásu, zahrnuje asi 124 druhů, většina je jednodomých, 13 je dvoudomých.² Typickým znakem jsou jednoduché, často dlanitolaločné až dlanitodílné, někdy dlanitě (z 3-5 lístků) složené listy. Květy jsou uspořádané v latách, hroznech nebo chocholících. Plodem je křídlatá dvounažka.¹ Na našem území se nejčastěji vyskytuje *Acer pseudoplatanus* (javor klen), *Acer platanoides* (javor mléč) a *Acer campestre* (javor babyka). V zahradnické praxi se pěstuje *Acer tartaricum* (javor tatarský) a blízkce příbuzný *Acer ginnala* (javor ginala). Jeden z nejčastěji kvetoucích javorů je severoamerický druh *Acer saccharinum* (javor stříbrný). Dalším severoamerickým představitelem je *Acer saccharum* (javor cukrový), z něhož se získává javorový sirup a *Acer rubrum*. Z východní Asie a Japonska pochází *Acer nikoense*, *Acer japonicum* (javor vějířovitý), *Acer mono* (na podzim tvoří červené olistění), *Acer palmatum* (javor dlanitý) a *Acer truncatum* (javor žlutý), který má husté tmavozelené olistění a na podzim zlatožluté.^{4,39} *Acer okamotoanum* je endemický korejský javor rostoucí v horách Ullung Islandu.²⁵

2.1.3 Charakteristika druhu *Acer platanoides* L.

Systematické zařazení:

Říše: *Plantae*

Oddělení: *Magnoliophyta*

Třída: *Magnoliopsida*

Podtřída: *Rosidae*

Řád: *Sapindales*

Čeleď: *Aceraceae*

Rod: *Acer*

Druh: *Acer platanoides* L.
(javor mléč)²²



Obr. 1: Květ *Acer platanoides*⁴¹

Acer platanoides je 20-30 m vysoký strom s široce oválnou až kulovitou korunou dožívající se 120-150 let. Kmen dosahuje až 1 m v průměru, borka je tmavě šedá a hustě podélně brázditá. Listy má vstřícné, dlouze řapíkaté, dlanitě 5-7 laločné. Laloky listů jsou špičaté, s ostrými, hrubými a oddálenými zuby. Řapík po utržení roní bílé mléko, které obsahuje latex. Květy vyrůstají v koncových chocholících, jsou 5-četné, zelenožluté (obr. 1). Korunní lístky obvejčité, 5-6 mm dlouhé, kališní lístky jsou kratší.¹ V samčích květech se nachází 5-10 tyčinek. Kveté v dubnu až květnu před rašením listů. U druhu *Acer platanoides* se projevuje sklon k přechodu od oboupohlavních květů k vytváření květů odděleného pohlaví. Asi 12 % stromů má pouze květy samčí, tedy neplodí, ovšem plně plodné stromy jsou ještě vzácnější.⁴ Plodem jsou ploché křídlaté dvounažky dozrávající v září, které svírají tupý až přímý úhel. Roste na minerálně bohatých, hlinitých, vlhkých půdách na polostinném stanovišti a to převážně v suťových roklinových lesích, dubových a lipových hájích a květnatých bučinách. Snáší kouřové plyny a daří se mu i v městském prostředí, je odolný vůči nemocem a škůdcům.^{1,4}

Byla vyšlechtěna řada okrasných kultivarů, mezi některé zástupce patří:

- *Acer platanoides* cv. Globosum - má hustou, malou, kulovitou korunu,
- *Acer platanoides* cv. Dissectum - je to ozdobný kultivar se stříhaným listem,
- *Acer platanoides* cv. Schwedleri - na jaře má červené listy,
- *Acer platanoides* cv. Krimson King - tmavě červené listy má během celé vegetační doby,
- *Acer platanoides* cv. Columnare a Olmsted - jsou to sloupovitě rostoucí kultivary.

Acer platanoides má tvrdé dřevo, za sucha trvanlivé, dobře se moří a impregnuje. Hlavní použití má při výrobě nábytku a hudebních nástrojů.⁴

2.2 Obsahové látky a využití zástupců čeledi *Aceraceae*

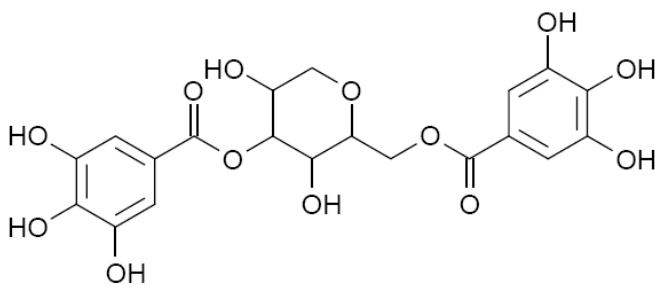
Z obsahových látek v čeledi *Aceraceae* jsou běžné flavonoly (hlavně kempferol, kvercetin) a dále kyselina gallová a ellagová.¹

Acer platanoides

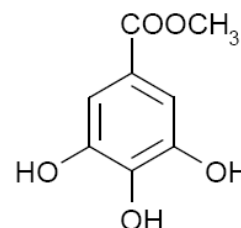
Z červených listů *Acer platanoides* cv. Crimson King byly izolovány cyanidin 3-(2"-galloyl- β -glucopyranosid) (37 %), cyanidin 3- β -glucopyranosid (60 %) a diacetylovaný anthocyanin - cyanidin 3-(2",3"-digalloyl- β -glucopyranosid)(3 %).³⁷

Acer ginnala

Acer ginnala je v Koreji značně rozšířený strom, jehož míza se v lidové medicíně používá na léčbu žaludečních potíží a průjmu. Z methanolového extraktu listů *Acer ginnala* byly izolovány acertannin (obr. 2) a methylgallát (obr. 3).³⁴



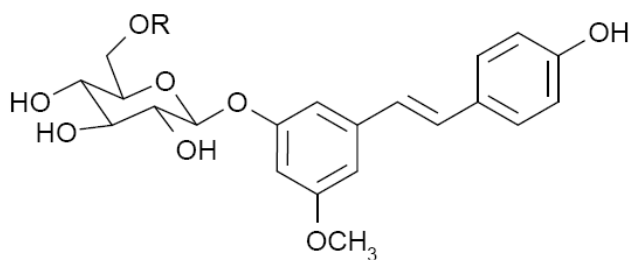
Obr. 2: Acertannin



Obr. 3: Methylgallát

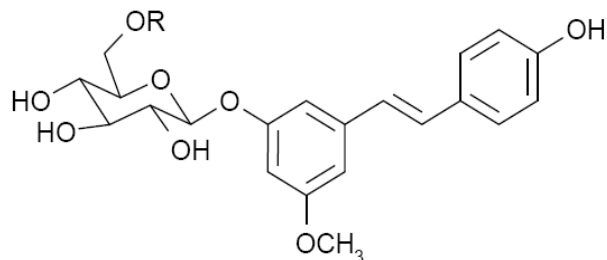
Acer mono

Z listů japonského javoru *Acer mono* byly izolovány dva glykosidické stilbeny (obr. 4 a 5) a kvercetin (obr. 6). Listy *Acer mono* se v Koreji používají v lidové medicíně pro účinky hemostatické, kořeny na léčbu bolesti kloubů a míza *Acer mono* na léčbu gastroenterálních a neuralgických obtíží.²⁶



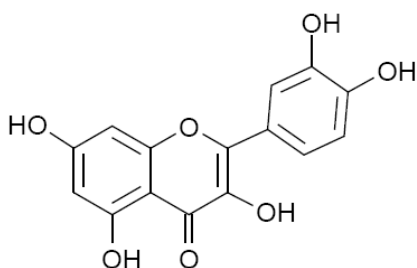
Obr. 4: 5-O-methyl-(E)-resveratrol 3-O- β -D-glucopyranosid

R=H

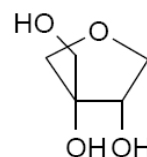


Obr. 5: 5-O-methyl-(E)-resveratrol 3-O- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosid

R= β -O-apiosa

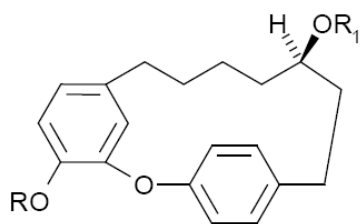


Obr. 6: Kvercetin



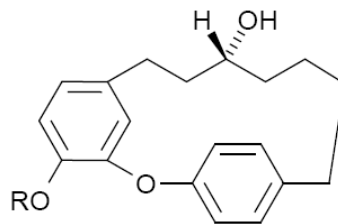
Acer nikoense

Kůra *Acer nikoense* je využívána v lidové medicíně na léčení jaterních onemocnění a očních chorob. Z ethylacetátové frakce kůry bylo izolováno devět cyklických diarylheptanoidů (obr. 7-15), jeden acyklický (obr. 16) a dvě fenolické sloučeniny (obr. 17-18).¹⁴



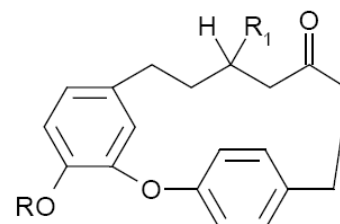
Obr. 7: Acerogenin A:

R=R₁=H



Obr. 10: (R)-Acerogenin B:

R=H



Obr. 12: Acerogenin D:

R=H, R₁=OH

Obr. 8: Acerosid I:

R=Glc, R₁=H

Obr. 11: Acerosid B₁:

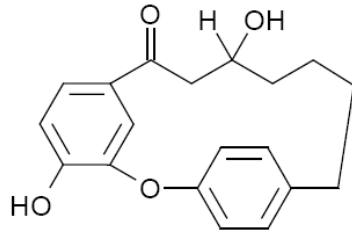
R=Glc

Obr. 13: Acerosid IV:

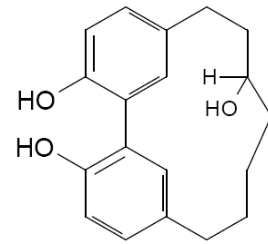
R=Glc, R₁=H

Obr. 9: Acerosid III:

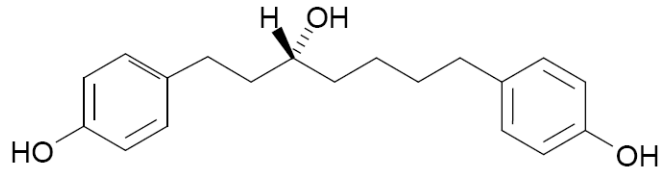
R=H, R₁=Glc-(6 \rightarrow 1)-Api



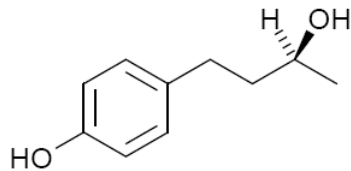
Obr. 14: Acerogenin M



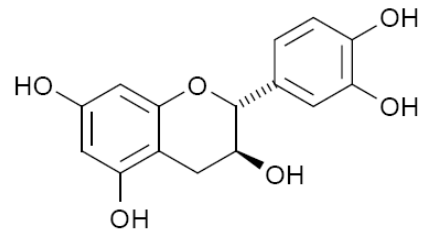
Obr. 15: Acerogenin K



Obr. 16: (-)-Centrolol

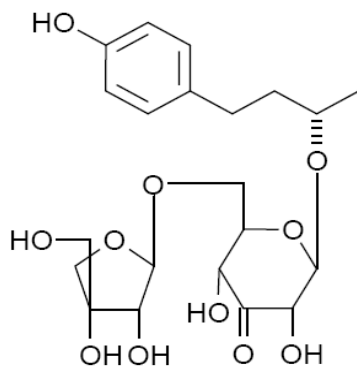


Obr. 17: (+)-Rhododendrol

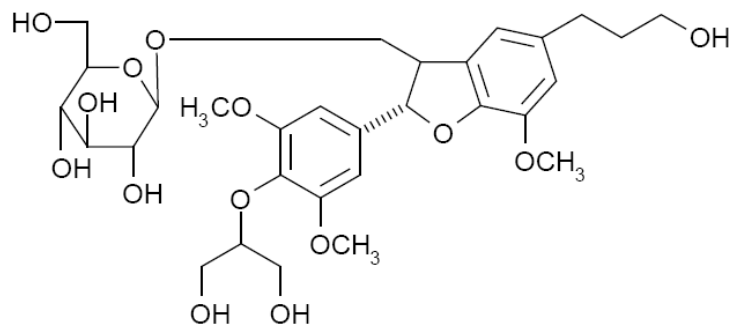


Obr. 18: (+)-Katechin

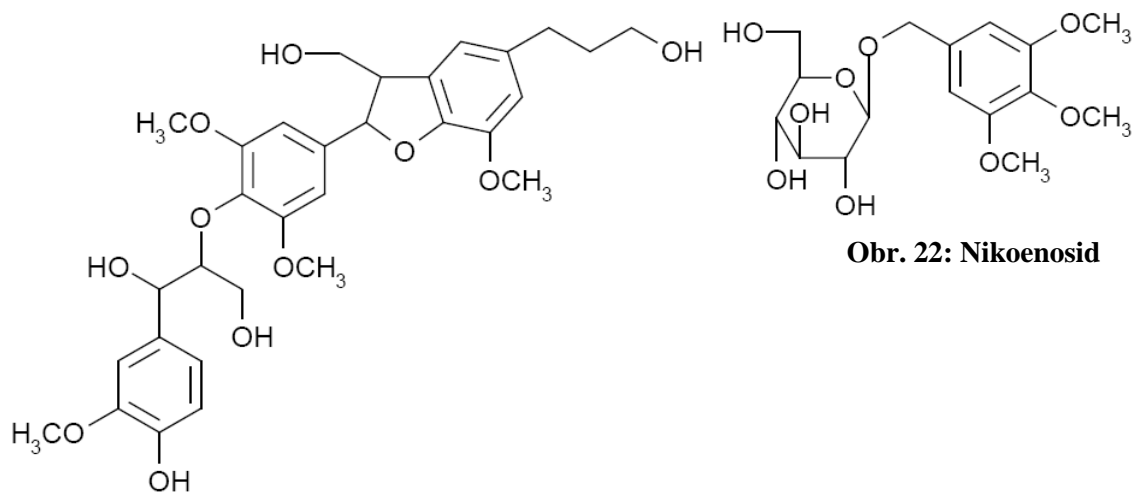
Z kůry kmene *Acer nikoense* byly také izolovány rhododendroketosid (obr. 19), (-)-sakuraresinosid (obr. 20), acernikol (obr. 21) a nikoenosid (obr. 22).²⁸



Obr. 19: Rhododendroketosid



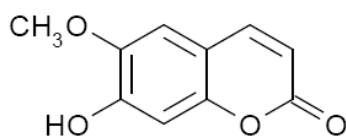
Obr. 20: (-)-Sakuraresinosid



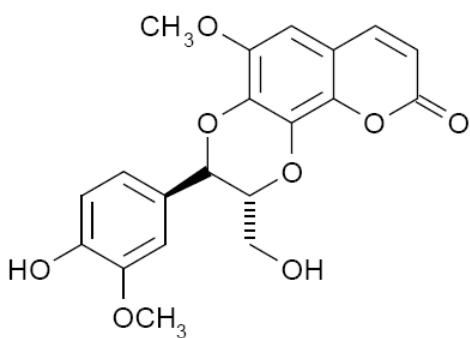
Obr. 21: Acernikol

Obr. 22: Nikoenosid

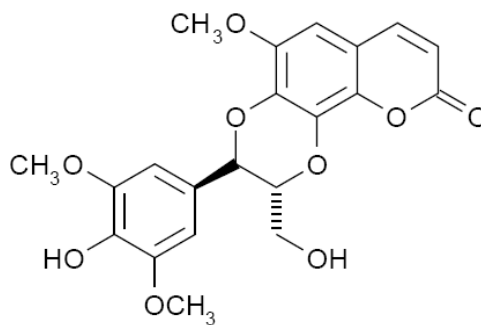
Z etherového extraktu dřeva *Acer nikoense* byly izolovány skopoletin (obr. 23) a kumarinolignany cleomiscosin A (obr. 24) a aquillochin (obr. 25).¹⁵



Obr. 23: Skopoletin

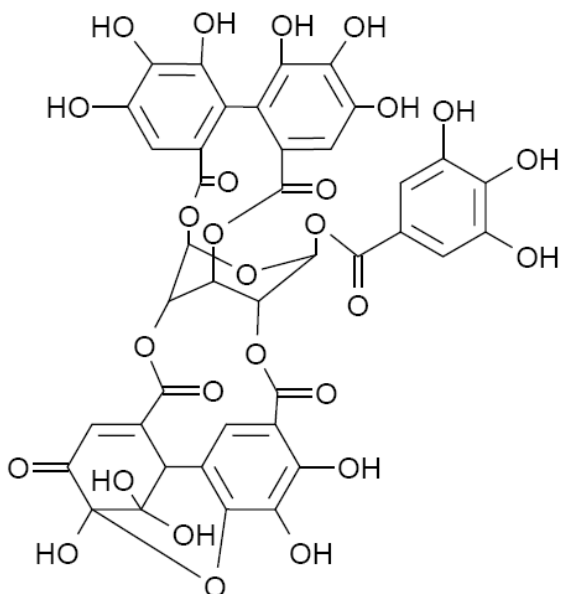


Obr. 24: Cleomiscosin A

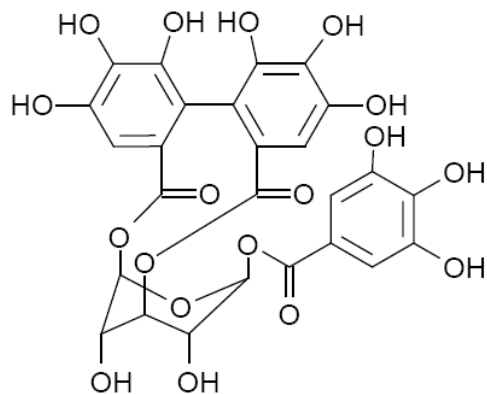


Obr. 25: Aquillochin

Z extraktu listů *Acer nikoense* byly izolovány dvě složky s antitumorovou aktivitou - geraniin (obr. 26) a corilagin (obr. 27). Geraniin je obsažen také v další japonské léčivé rostlině - *Geranium thunbergii* (*Geraniaceae*), která se používá jako antidiarrheticum.²⁷



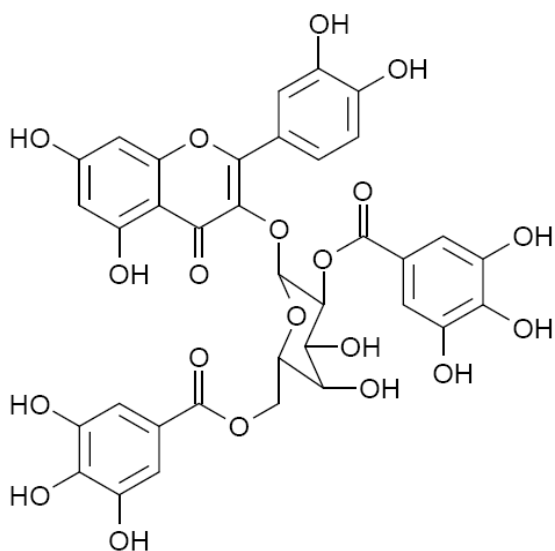
Obr. 26: Geraniin



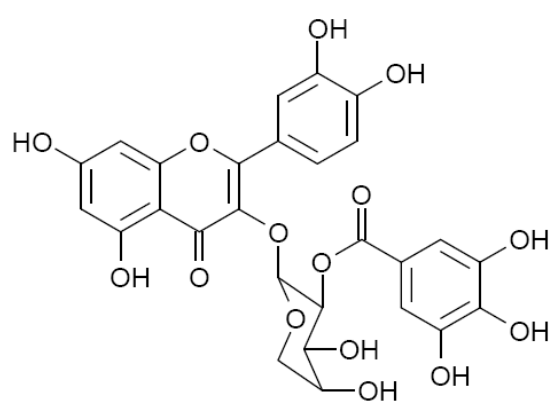
Obr. 27: Corilagin

Acer okamotoanum

Z ethylacetátového frakce methanolového extraktu listů *Acer okamotoanum* byly izolovány flavonolové glykosidy a fenolické sloučeniny. Nejsilnější aktivitu inhibice HIV-1 integrázy vykazovaly kvercetin 3-O-(2'',6''-O-digalloyl)- β -D-galactopyranosid (obr. 28) a kvercetin 3-O-(2''-galloyl)- α -L-arabinopyranosid (obr. 29).⁴⁰

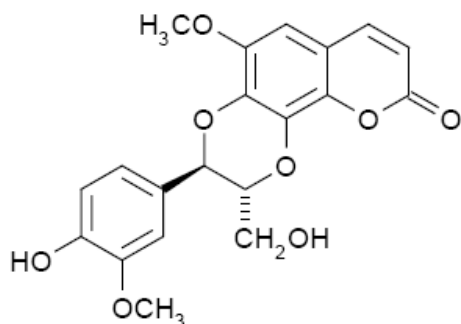


Obr. 28: Kvercetin 3-O-(2'',6''-O-digalloyl)- β -D-galactopyranosid

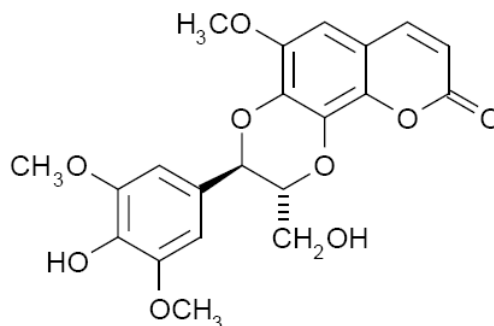


Obr. 29: Kvercetin 3-O-(2''-galloyl)- α -L-arabinopyranosid

Z ethylacetátové frakce methanolového extraktu listů a větvíček *Acer okamotoanum* byly dále izolovány cleomiscosin A (obr. 30) a C (obr. 31).²⁵



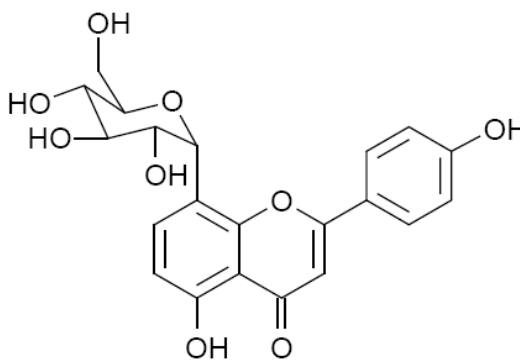
Obr. 30: Cleomiscosin A



Obr. 31: Cleomiscosin C

Acer palmatum

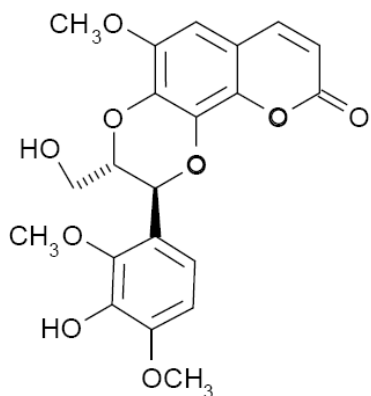
Z *Acer palmatum* byla izolována řada fenolických látek, např. cyanidin, cyanidin galloylglucosid, cyanidin acetylrutinosid a také flavonoid vitexin (obr. 32). Ten byl získán z ethylacetátové frakce extraktu barevně zbarvených listů sbíraných v říjnu a listopadu.²³



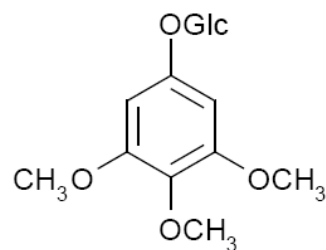
Obr. 32: Vitexin (apigenin-8-C-β-D-glucopyranosid)

Acer saccharum

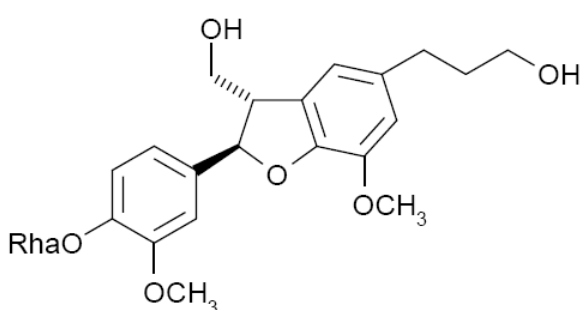
Z ethylacetátového extraktu xylému byly izolovány látky fenolické povahy - např. kumariny skopoletin (obr. 23), cleomiscosin C (obr. 31), cleomiscosin D (obr. 33), fenolický derivát koabursid (obr. 34) a benzofuran icarisid E4 (obr. 35). Stejně fenolické sloučeniny byly izolovány z ethylacetátového extraktu listů *Acer saccharum*. Navíc byly získány tři látky flavonoidní povahy (obr. 36-38).¹³



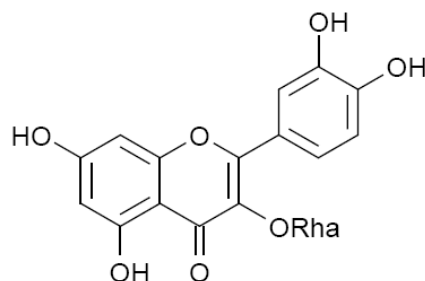
Obr. 33: Cleomiscosin D



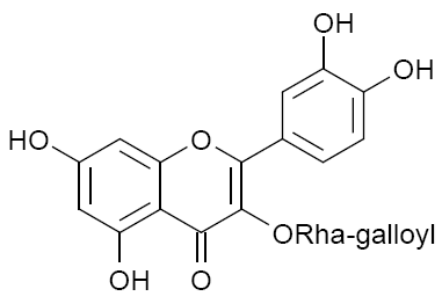
Obr. 34: Koabursid



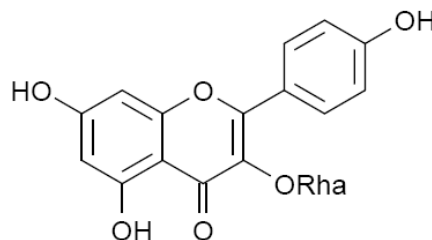
Obr. 35: Icarisid E4



Obr. 36: Kvercitrin



Obr. 37



Obr. 38: Afzelin

Javorový sirup

Javorový sirup je nejdůležitější rostlinný produkt kanadské provincie Quebec. Získává se z mízy *Acer saccharum*, která vytéká při poranění kmene do sběrných nádob. Míza je zahušťována odpařováním vody na 1/35 až 1/40 objemu. Na začátku sezóny (únor) má sirup světlou barvu, v pozdějším období je tmavý. Hlavní složkou jsou sacharidy (tvoří až 98-99 % sušiny) a to především sacharóza a v menší míře glukóza a fruktóza. Dále obsahuje organické

kyseliny (kyselina fumarová, jablečná), minerály (draslík, vápník, železo), aminokyseliny, vitamíny a fenolické sloučeniny, které ovlivňují barvu a chuť sirupu.^{10,11}

Pomocí HPLC byly izolovány a identifikovány fenolické sloučeniny obsažené v javorovém sirupu (získaný v roce 2007, Ontario, Kanada). Byly izolovány kyselina benzoová, deriváty kyseliny skořicové (kyselina p-kumarová, kyselina 4-methoxyskořicová, kyselina kávová, kyselina ferulová, sinapová a ester kyseliny chlorogenové), dále katechin a epikatechin, kempferol a jeho 3-O- β -D-glucosid a 3-O- β -D-galaktosid, kvercetin a jeho 3-O- β -D-glucosid a 3-O-L-rhamnosid a také rutin.¹²

Acer truncatum

Acer truncatum roste na severozápadě Číny. V lidové čínské medicíně se používá na léčbu arteriosklerózy, cerebrovaskulárních chorob a anginy pectoris. Hlavní skupinou obsahových látek jsou především flavonoidy. Z ethylacetátového extraktu listů byl izolován kvercetin-3-O-L-rhamnosid (obr. 36).³⁵

Rod Negundo

Rod *Negundo* se od ostatních zástupců čeledi *Aceraceae* odlišuje. Neobsahuje katechiny, chybějí i flavonoidy a naopak obsahuje saponiny. Významný je též poměr syringaldehydu k vanilinu v ligninu u rodu *Acer* 1:2 a u rodu *Negundo* je 2:1.^{1,4}

2.3 Biologická aktivita obsahových látek rostlin čeledi *Aceraceae*

2.3.1 Vazorelaxační účinky

Etherový extrakt dřeva *Acer nikoense*, jehož hlavními obsahovými látkami jsou skopoletin a kumarinolignany cleomiscosin A a aquillochin, vykazoval pomalé vazorelaxační účinky na aorty sameček krys Wistar. Kontrakce aort byla způsobena předchozím přidáním noradrenalinu o koncentraci $3 \cdot 10^{-7}$ M. Vazorelaxační aktivita byla zaznamenána jak u aort s endothelinem, tak bez endothelinu.¹⁵

2.3.2 Antioxidační a antiradikálová aktivita

Z ethylacetátového extraktu xylému a listů *Acer saccharum* byly izolovány látky fenolické povahy, u kterých byla měřena a prokázána schopnost vychytávat volné kyslíkové

radikály metodou měření SOD (superoxiddizmutázové) aktivity. Cleomiscosin C a cleomiscosin D předčily svou aktivitou vitamín C.¹³

Z javorové mízy a sirupu *Acer saccharum* byly izolovány látky fenolické povahy v různých obdobích roku. Ethylacetátový extrakt fenolických složek byl rozpuštěn v methanolu a na koloně byly separovány glykosidy a aglykony. Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí spektrofotometrické metody spočívající v měření TBARS (látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou) vzniklé během peroxidace lipozómů. Antioxidační aktivita byla ekvivalentní inhibici lipidové peroxidace. Antiradikálová aktivita byla měřena pomocí kolorimetrické DPD metody (s N,N-diethyl-p-phenylendiaminem). Výsledky studie ukázaly, že izolované fenolické látky měly antioxidační i antiradikálové účinky. Naměřené hodnoty antioxidační aktivity jednotlivých extraktů se lišily v průběhu roku a nebyl zde zjištěn vzájemný vztah mezi množstvím obsažených fenolických látek a antioxidační aktivitou. Schopnost vychytávat volné radikály korespondovala s množstvím fenolických látek v extraktech mízy i sirupu.¹⁶

Methanolvý extrakt listů *Acer ginnala* vykazoval nejsilnější antioxidační vlastnosti ze 45 testovaných extraktů rostlin. Byly z něho izolovány čisté látky acertannin a methylgallát. Antioxidační vlastnosti methanolového extraktu byly testovány metodou vychytávání DPPH radikálu s IC_{50} 15 $\mu\text{g/ml}$. Methylgallát byl izolován také z *Acer saccharinum*, přičemž vykazoval antitumorovou aktivitu.³⁴

Z ethylacetátové frakce methanolového extraktu listů *Acer okamotoanum* byly izolovány dva kumarinolignany cleomiscosin A a C. Cleomiscosin C značně inhiboval peroxidaci LDL částic indukovanou buď Cu^{2+} ionty nebo volnými radikály vzniklými z azosloučeniny AAPH (2,2'-azobis-(2-amidinopropan) dihydro-chloridu). Fluorescenční analýzou bylo zjištěno, že cleomiscosin A a cleomiscosin C mají protektivní účinky proti oxidaci apolipoproteinu B-100, která byla indukovaná buď ionty Cu^{2+} nebo HOCl.²⁵

Methanolvý extrakt z kůry *Acer nikoense* a z něj získané frakce vykazovaly značnou antioxidační aktivitu. Antioxidační aktivita byla měřena metodou vychytávání DPPH radikálu. Silné antioxidační účinky byly zaznamenány u acerogeninu A, acerosidu III, (R)-acerogeninu B a acerogeninu D. Výsledky ukázaly, že antioxidační aktivita diarylheptanoidů byla závislá na přítomnosti volných fenolických hydroxylových skupin. Diarylheptanoidy s glykosilovanými fenolickými skupinami měly mnohem nižší antioxidační účinky než diarylheptanoidy s volnými hydroxylovými skupinami.¹⁴

Vitexin, izolovaný z extraktu listů *Acer palmatum*, byl testován na schopnost vychytávat volné radikály vznikající po expozici UVB záření (20 mJ/cm^2) na kultury buněk lidských dermálních fibroblastů (HDFs). ROS byly detekovány inkubací HDFs s 5-(6-)chloromethyl-2',7'-dichlorodihydroflourescein diacetátem (CM-H₂DCFDA), který se intracelulárně hydrolyzoval a následně s peroxidem vodíku dával vznik floureskujícímu dichloroflouresceinu (DCF). Výsledky ukázaly, že vitexin přidáný ke kultuře buněk HDFs výrazně snižoval oxidaci CM-H₂DCFDA a tím tedy i fluorescenci testovaného vzorku. Vitexin měl schopnost vychytávat peroxid vodíku, který vznikl po UVB radiaci na HDFs.²³

2.3.3 Protinádorová aktivita

Diarylheptanoidy a dvě fenolické sloučeniny (rhododendrol a katechin), získané z ethylacetátového extraktu kůry *Acer nikoense*, měly inhibiční účinky na melanogenezi myších nádorových buněk B16. Účinek byl připisován cytotoxické aktivitě testovaných látek, které měly zároveň značný vliv na snižování životnosti buněk. Největší protinádorovou aktivitu vykazovaly látky acerosid I a acerogenin M. Výhodou těchto dvou látek bylo, že nesnižovaly životnost buněk (ty měly hodnoty 100,1 % a 108,0 %).¹⁴

Geraniin a corilagin, izolované z extraktu listů *Acer nikoense*, měly inhibiční účinek na uvolňování TNF- α (Tumor necrosis factor- α). IC₅₀ inhibice uvolňování TNF- α byla pro geraniin 43 μM , pro corilagin 76 μM a pro látku obsaženou v zeleném čaji (-)-epigallocatechingallát 26 μM . Navíc geraniin redukoval procentuálně nárůst tumorových ložisek myši kůže (iniciovaných okadaicovou kyselinou a 7,12-dimethylbenz(a)anthracenem) z 80 % na 40 %.²⁷

Fenolické látky, izolované z javorové mízy a sirupu odebrané v různých obdobích roku, a dále oddělené aglykony a glykosidy, byly testovány na antimutagenní vlastnosti před a po metabolizaci v játrech samečků krys Wistar. Byl použit tzv. Umu test, kdy byla měřena schopnost inhibovat indukci SOS genu (umu C) navozenou chemickými mutageny v buňkách *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002. Tyto buňky obsahovaly fúzi genu umuC-lacZ, který produkoval hybridní protein s aktivitou β -galaktosidázy, jenž je produkován jako odpověď genu na přítomnost mutagenních činitelů. Metabolizované fenolické extrakty mízy i sirupu vykazovaly vyšší antimutagenní vlastnosti než nemetabolizované extrakty. Z toho vyplynulo, že fenolické látky získaly antimutagenní vlastnosti až po metabolizaci v játrech. Metabolizované glykosidy z javorového sirupu a mízy vykazovaly menší antimutagenní

aktivitu než metabolizované aglykony. Metabolizované aglykony přítomné v javorovém sirupu měly vyšší antimutagenní aktivitu než v javorové míze.¹⁶

Alkoholový extrakt listů a větviček *Acer negundo* vykazoval značné inhibiční účinky na sarkom 180 u myši. Systematickou frakcionací extraktu byly získány dvě kyselé saponinové frakce. Jedna z nich měla značnou inhibiční aktivitu proti Walker intramuskulárnímu karcinosarkomu 256 u krys.²⁹

Ethylacetátový extrakt listů *Acer truncatum* vykazoval inhibiční aktivitu na syntázu mastných kyselin (FAS=fatty acid synthase). FAS je enzym, který syntetizuje mastné kyseliny, účastní se energetického metabolismu a je zodpovědný za některé lidské choroby jako obezita nebo rakovina. Bylo zjištěno, že lidské rakovinné buňky produkují vysoké množství FAS, a že inhibitory FAS jsou selektivně cytotoxické na mnoho druhů lidských rakovinových buněk. Extrakt *Acer truncatum* vykazoval větší inhibiční aktivitu na FAS než (-)-epigallocatechingallát a vykazoval značnou inhibici proti růstu čtyř druhů rakovinových buněk. Inaktivace FAS byla připisována společně souhře všech složek v extraktu.³⁶

2.3.4 Hepatoprotektivní aktivita

Z ethylacetátové frakce methanolového extraktu *Acer mono* byly izolovány dva glykosidické stilbeny a kvercetin (obr. 4-6), které vykazovaly značné hepatoprotektivní účinky na kultury buněk krysích hepatocytů, jež byly vystaveny toxickému vlivu peroxidu vodíku.²⁴

Schopnost vylučovat volné kyslíkové radikály obou stilbenů izolovaných z *Acer mono* byla nízká. Jejich hepatoprotektivní účinek byl připisován schopnosti podporovat antioxidační obranné mechanismy buněk. Stilbeny zabraňovaly snížení aktivity antioxidačních enzymů (SOD, GSH-px, GR) a zvyšovaly množství GSH v krysích hepatocytech vystavených působení peroxidu vodíku.²⁶

2.3.5 Inhibice α -glukosidázy

Funkcí α -glukosidázy je hydrolýza alfa-glukosidové vazby (především 1,4 vazby, méně 1,6 vazby). Hlavním štěpným substrátem je sacharóza a maltóza. Její inhibicí dochází k menšímu vstřebávání cukrů ze střeva a tím ke snížení postprandiální glykémie, což má význam v prevenci diabetes mellitus a obezity. Fenolické sloučeniny obsažené v xylému, listech a javorovém sirupu z *Acer saccharum* vykazovaly značnou inhibiční aktivitu na

α -glukosidázu. Tmavý javorový sirup měl silnější inhibiční aktivitu na α -glukosidázu než světlý javorový sirup Canada No. 1 medium z důvodu vyššího podílu fenolických látek.¹³

2.3.6 Inhibice β -hexaminidázy (antialergické účinky)

β -hexaminidáza je uložena v sekrečních granulích žírných buněk a je uvolněna současně s histaminem po stimulaci antigenem nebo navozenou degranulací. Byly testovány účinky obsahových látek z kůry kmene *Acer nikoense* na inhibici uvolňování β -hexaminidázy z RBL-2H3 buněk po předchozí sensitizaci anti-DNP IgE. Acerogeniny B ($IC_{50}=50 \mu M$) a K ($IC_{50}=33 \mu M$) vykazovaly inhibiční aktivitu a jejich aktivita byla silnější než dvou antialergik- tranilastu ($IC_{50}=0,49 mM$) a ketotifenu fumarátu ($IC_{50}=0,22 mM$).²⁸

2.4 Použité metody

2.4.1 Měření antioxidační aktivity-úvod

Polyfenolické sloučeniny jsou sekundární metabolity rostlin, které vykazují rozmanitou biologickou aktivitu. Významné jsou jejich antioxidační vlastnosti a schopnost eliminovat volné radikály.²¹

Volné radikály

Volné radikály jsou atomy, ionty, molekuly, které mají ve svém elektronovém obalu nepárový elektron. Chybějící elektron se snaží doplnit, proto jsou málo stabilní a vysoce reaktivní. Patří sem reaktivní kyslíkové radikály (ROS) a reaktivní dusíkové radikály (RNS).²⁰ V živých organismech reagují s řadou biologických struktur, především s mastnými kyselinami a lipidy, bílkovinami, nukleovými kyselinami, nízkomolekulárními metabolity nebo koenzymy. Podílí se na fyziologických funkcích organismu.¹⁷ Při porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním volných radikálů vzniká oxidační stres. Volné radikály pak působí jako toxické látky, které mohou pozměňovat strukturu biomolekul a modifikovat jejich funkce.^{17,21}

Antioxidační mechanismy

Organismus se chrání proti toxickému vlivu volných radikálů různými mechanismy. Patří mezi ně např. enzymové antioxidační systémy:

- superoxiddizmutáza (je obsažena v každé buňce, přeměňuje superoxidový radikál na O_2 a H_2O_2),
- glutathionperoxidáza (katalyzuje redukci H_2O_2 a současnou oxidaci glutathionu),
- glutathiontransferáza (katalyzuje konjugační reakci, při které je sulfhydrylová skupina glutathionu navázána na elektrofilní organickou látku a tím je detoxikována)
- kataláza (štěpí H_2O_2 na vodu a kyslík).¹⁷

Dále se na ochraně organismu podílí některé transportní a zásobní bílkoviny (např. transferin, ferritin), které vychytávají přechodné kovy a tím zabraňují jejich vstupu do Fentonovy reakce, při níž vznikají volné radikály. Významné ochranné účinky mají také endogenní nízkomolekulární antioxidanty. Patří mezi ně glutathion (jeden z nejvýznamnějších redoxních pufrů buňky), kyselina lipoová, bilirubin, kyselina močová, ubichinon, melatonin, aj. S potravou se do organismu dostávají další významné látky s antioxidačními účinky, kterými jsou nejen některé vitamíny (vitamín C, vitamín E, karotenoidy, vitamín A), ale také látky fenolické povahy.¹⁷

Antioxidační vlastnosti fenolických látek

Fenolické látky jsou značně rozšířené v rostlinné říši - v ovoci, zelenině, rostlinách a také v různých rostlinných produktech, např. v červeném víně, čaji, kakau. Obsahují jedno nebo více aromatických jader, které jsou substituované hydroxylovými skupinami. Patří mezi ně např. fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbeny, lignany.¹⁹

Farmakologické vlastnosti fenolických látek souvisí především s antioxidační aktivitou. Např. flavonoidy přímo reagují (vychytávají) volné radikály vznikající ve tkáních, nebo vytváří chelátové vazby s přechodnými kovy (např. mědí a dvojmocným železem) a tím zabraňují těmto kovům katalyzovat vznik nebezpečného hydroxylového radikálu ve Fentonově reakci. Dále mají schopnost inhibovat některé enzymy katalyzující vznik volných radikálů (např. 5-lipoxygenázu, NADPH-oxidázu). Podílí se na regeneraci vitamínu E a C a také mohou mít synergický účinek s dalšími antioxidanty.^{17,18,20}

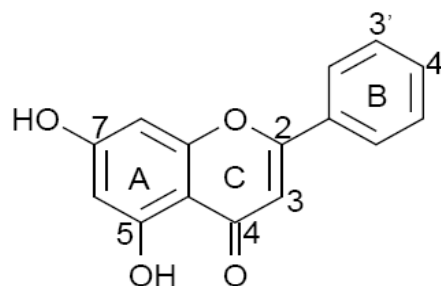
Fenolické látky jsou snadno oxidovatelné a jejich význam spočívá ve schopnosti redukovat některé ROS. Při reakci poskytují vodíkový atom z hydroxylové skupiny a tím většinou dochází k jejich přeměně na málo reaktivní fenoxylový radikál nebo neradikálové

chinoidní struktury.^{19,31} Mnoho fenolických látek, stejně tak flavonoidů, má antioxidační kapacitu silnější než vitamínu C a E.³¹

Antioxidační aktivita flavonoidů

Řada autorů se věnuje vztahu mezi chemickou strukturou flavonoidů a antioxidační aktivitou.^{18,31} Základ flavonoidní struktury (obr. 39) tvoří chroman, který je arylovaný v poloze:

- 2 (flavany)
- 3 (izoflavany)
- 4 (neoflavany)³⁸



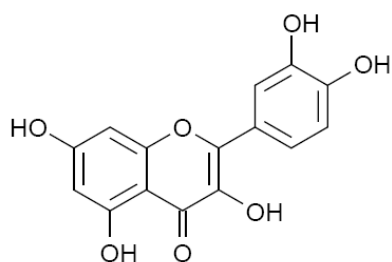
Obr. 39: Flavonoidní struktura

Všechny flavonoidy mají stejný biosyntetický původ a základní strukturu a podle stupně oxidace centrálního pyranového kruhu se dělí:

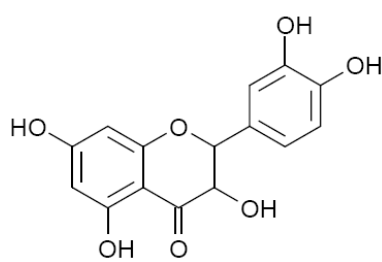
- 2-fenylbenzopyriliové deriváty (anthocyanidiny),
- 2-fenylchromony – flavony, flavonoly a jejich dimery, flavanony a dihydroflavonoly,
- 2-fenylchromany – flavany, flavan-3-oly a flavan-3,4-dioly a jejich oligomery a polymery (tj. proanthocyanidiny, které se řadí mezi tanniny),
- chalkony a dihydrochalkony,
- aurony.⁴²

Schopnost vychytávat volné radikály závisí na struktuře molekuly a substituci hydroxylovými skupinami. Důležitější než počet hydroxylových skupin je jejich lokalizace. Bylo zjištěno, že efektivní schopnost vychytávat ROS měly flavonoidy s 3',4'-dihydroxy substitucí (catecholovou skupinou) kruhu B anebo s hydroxylovou skupinou v pozici C-3 kruhu C.³¹

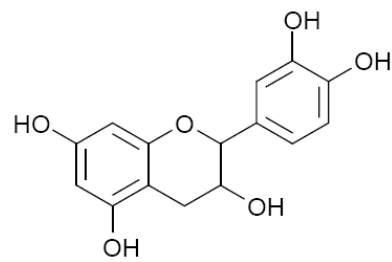
Byly porovnány antioxidační vlastnosti tří fenolických látek: kvercetinu (obr. 40), taxifolinu (obr. 41) a katechinu (obr. 42), které mají odlišnou základní strukturu, ale stejnou hydroxylaci (3,5,7,3',4'-OH).



Obr. 41: Kvercetin

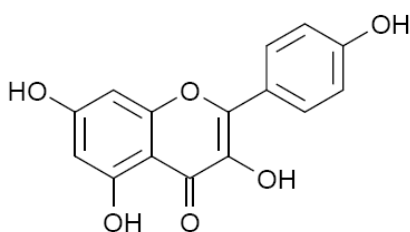


Obr. 42: Taxifolin

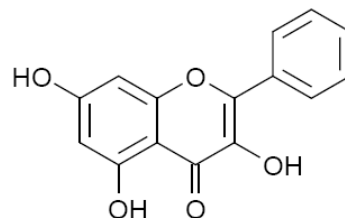


Obr. 43: Katechin

Tyto látky vykazovaly vysokou a velmi podobnou antioxidační aktivitu, což vedlo k závěru, že přítomnost o-katecholové skupiny (3',4'-OH) v B-kruhu je hlavním činitelem vysoké antioxidační aktivity. Také flavonoidy, které mají jenom jednu hydroxylovou skupinu v B-kruhu, např. kempferol (obr. 44) nebo žádnou, např. galangin (obr. 45), vykazovaly vysokou antioxidační aktivitu. Tato vlastnost byla připsána kombinaci dvojné vazby a hydroxylaci kruhu C v poloze C-3. Dvojná vazba uděluje vyšší rigiditu kruhu C a kruhy A a C jsou v jedné rovině.^{18,31} Dvojná vazba kruhu C konjugovaná s keto skupinou v poloze 4 rovněž zvyšuje schopnost flavonoidů vychytávat ROS, tedy zvyšuje jejich antioxidační vlastnosti.³¹



Obr. 44: Kempferol



Obr. 45: Galangin

2.4.2 Metody stanovení antioxidační aktivity

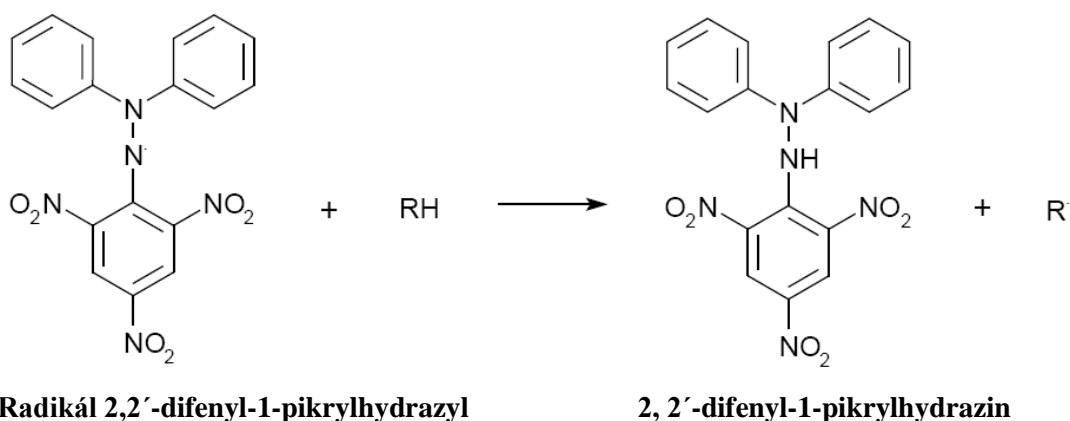
Přesné vymezení antioxidační aktivity nízkomolekulárních antioxidantů je problematické, protože působí různými mechanismy. K hodnocení míry antioxidační aktivity se využívá množství metod, které jsou založené na různých principech. Obecně se dělí na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a metody posuzující redoxní vlastnosti látek. Testuje se aktivita jednotlivých izolovaných látek, nebo směsných vzorků, ve kterých se mohou jednotlivé složky vzájemně synergicky či inhibičně ovlivňovat.²¹

V této práci byla ke stanovení antioxidační aktivity použita metoda sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu.

2.4.2.1 Metoda sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu (SIA)

Tato metoda umožňuje hodnotit schopnost vzorku eliminovat (vychytávat) volný DPPH radikál. Je to jedna ze základních metod posuzující antiradikálovou aktivitu čistých látek a také směsí vzorků. Pokud je v roztoku přítomen antioxidant, DPPH se redukuje na 2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazin nebo jeho substituované analogy. Dochází k odbarvení roztoku. Mechanismus reakce je znázorněn na schématu (obr. 46). Redukce se sleduje nejčastěji spektrofotometricky. Měří se absorbance při určité vlnové délce po uplynutí určitého konstantního času nebo se pracuje v kinetickém režimu.²¹

Obr. 46: Redukce volného radikálu DPPH³¹



Pro rychlé monitorování a vyhodnocení antioxidační aktivity biologických vzorků se používá počítačem kontrolovaný systém sekvenční injekční analýzy vybavený spektrofotometrickým detektorem diodového pole. Tato metoda je rovněž založena na již zmíněné reakci DPPH s antioxidačními látkami, které jsou obsažené v organických nebo vodně-organických testovaných vzorcích. Snížení absorbance měřené při 525 nm souvisí s koncentrací antioxidantu v testovaném vzorku. Absorbance vzorku se měří vždy 3 krát. Díky rychlosti a citlivosti je SIA metoda využívána pro výkonný screening přítomnosti různých antioxidantů ve velké sérii lyofilizovaných rostlinných a houbových extraktů.³²

Vodné roztoky se připravují z vysoce čištěné deionizované vody. Jako slepý vzorek se používá 50% ethanol, který v systému SIA slouží též jako nosný proud. Před použitím se

50% ethanol odplynní v ultrazvukové lázni po dobu 5 minut. Roztok DPPH se připravuje vždy čerstvý v den měření. Koncentrace 0,1 mM se připraví rozpuštěním 3,9 mg DPPH v 60 ml 95% ethanolu ve 100ml odměrné baňce a doplnění se vodou na 100 ml. K úplnému rozpuštění je nutná pětiminutová sonikace. Odměrná baňka se zatemní zabalením do alobalu a je nutné ji uchovávat v chladu. Měřený vzorek se připraví rozpuštěním v 50% ethanolu tak, aby vznikla koncentrace 1 mg/ml. Takto připravený roztok se sonikuje 1 minutu a protřepe. Dále se postupným ředěním připraví koncentrace 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml a 0,0313 mg/ml.

SIA metoda využívá počítačem kontrolovaný FIALab 3000 analyzátor (řízený prostřednictvím programu FIALab for Windows 5,0), který je vybavený pístovým čerpadlem o objemu 2,5 ml, šesticestným selekčním ventilem, USB 2000-UV/VIS spektrofotometrem s LS-1 světelným zdrojem, průtokovou detekční celou a spojovacími hadičkami.

Charakteristickým rysem metody SIA jsou oddělené měřicí cykly. Zóny nosného média, analyzovaného vzorku a činidla jsou aspirovány do jednonábového systému s využitím selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla. Pohyb pístového čerpadla je následně obrácen, tím dojde k promísení zóny vzorku a činidla a tato směs je dopravena do detektoru, čímž je ukončen jeden cyklus. Výsledný analytický signál je získán ve formě píku, který představuje záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu jeho zóny detektorem (UV-VIS spektrofotometr).³²

Antioxidační účinek je vyjádřen v procentech poklesu absorbance oproti slepému vzorku:³²

$$\frac{C_{\text{prům.vzorku}}}{C_{\text{prům.DPPH}}} \times 100 = X$$
$$100 - X$$

2.5 Stanovení celkového obsahu fenolických látek - Folin-Ciocalteuova metoda

Celkový obsah fenolických látek v ethanolovém extraktu rostlin a hub umožňuje stanovit Folin-Ciocalteuova metoda. Výsledky jsou vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny gallové. Pro přípravu kalibrační křivky se smíchalo 0,25 ml ethanolického roztoku kyseliny gallové v alikvotních koncentracích 0,025-0,25 mg/ml s 0,25 ml Folin-Ciocalteuova činidla

(10 krát naředěný) a s 1 ml 7,5% uhličitanu sodného. Absorbance se měřila při pokojové teplotě po 30 minutách při 765 nm (Spectrophotometr Shimadzu UV-1601, UV Probe software). Následně se 0,25 ml ethanolového extraktu vzorku (1 mg/ml) smíchalo s 0,25 ml Folin-Ciocalteuova činidla (10 krát naředěný) a s 1 ml 7,5% uhličitanu sodného. Po 30 minutách při pokojové teplotě se měřila absorbance při 765 nm. Všechna měření proběhla 3 krát. Celkový obsah fenolických látek byl odečten z kalibrační křivky za použití UV Probe softwaru a byl vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové na mg extraktu (GAE/mg).³³

2.6 Separační metody

2.6.1 Extrakce

Extrakce tuhé látky kapalinou je prvním krokem při izolaci látek z rostlinných drog. Je to založeno na principu rozpouštění tuhé látky ve vhodném rozpouštědle. Při extrakci dochází k oddělení nízkomolekulárních látek od rostlinných tkání. Příkladem je macerace, což je jednostupňová nebo vícenásobná extrakce drogy, kdy se pevná fáze (droga) rozmíchá s rozpouštědlem. Stupeň extrakce se zvýší dokonalým rozdrobením drogy za intenzivního protřepávání či míchání. Následně se droga zfiltruje a vylisuje. Provádí se v nádobách, které musí být dobře uzavřené a dostatečně chráněné před světlem. Macerace může být krátkodobá (několik desítek minut) nebo dlouhodobá (několik dní).^{6,7}

2.6.2 Chromatografie

Chromatografie je fyzikálně-chemická separační metoda používaná k dělení směsi látek na jednotlivé složky a zároveň umožňuje jejich kvalitativní i kvantitativní analýzu. Rozdělení látek se dosahuje na základě jejich rozdílné migrace v systému dvou vzájemně nemísitelných fází - zakotvené (stacionární) a pohyblivé (mobilní). Stacionární fáze může být pevná látka (prášek nebo pórovitý materiál) nebo kapalina nanesená na tuhý nosič nebo gel a má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé složky analyzované směsi. Tok mobilní fáze je hybnou silou v chromatografickém systému. Mobilní fáze může být kapalná nebo plynná a vymývá jednotlivé složky směsi (ionty nebo molekuly) ze stacionární fáze a unáší je ve směru pohybu toku různou rychlostí, čímž dojde k jejich oddělení. Při chromatografii se mnohonásobně ustavuje dynamická rovnováha složek analyzované směsi mezi vratnou sorpcí na stacionární fázi a desorpcí do mobilní fáze. Rychlost pohybu jednotlivých složek závisí na sorbční rovnováze. Složky vzorku, které lnou ochotněji ke stacionární fázi než k fázi mobilní,

se při pohybu zdržují více než jiné složky, které se ke stacionární fázi poutají hůře. Tím se postupně složky od sebe separují.

Rozdělení chromatografických metod lze provést z několika hledisek:

- podle podstaty separačního děje – chromatografie adsorpční, rozdělovací, iontově výměnná, gelová a afinitní,
- podle pracovní techniky – chromatografie frontální, vytěšňovací a eluční,
- podle experimentálního provedení – chromatografie kolonová (sloupcová) a v plošném uspořádání (papírová, tenkovrstvá),
- podle zvoleného cíle – chromatografie analytická (kvalitativní, kvantitativní) a preparativní (izolační)
- podle povahy mobilní fáze – chromatografie kapalinová, plynová.^{5,6,7,9}

2.6.2.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

K chromatografickému procesu zde dochází při průtoku mobilní fáze tenkou vrstvou sorbentu nebo nosiče zakotvené fáze, který je buď volně nasypan, nebo fixován na vhodné neutrální podložce (skleněná deska, hliníková, popř. plastová fólie). Nejpoužívanějšími sorbenty jsou silikagel, oxid hlinitý a prášková celulóza.⁵

Vzorek se nanáší na start, který je blízko jednomu konci plochy. Deska je svou dolní hranou ponořena do mobilní fáze v chromatografické komoře. Mobilní fáze vzlíná tenkou vrstvou pomocí kapilárních sil a unáší s sebou složky vzorku tím rychleji, čím méně se poutají na stacionární fázi a jsou lépe rozpustné ve fázi mobilní. Jakmile čelo mobilní fáze dosáhne požadované vzdálenosti, chromatogram se vyjme a po vysušení je provedena detekce. Pro každou složku na chromatogramu je charakteristická její poloha vyjádřená hodnotou R_F (retenční faktor). Pokud nejsou složky tvořeny barevně zbarvenými látkami, použije se k detekci postřík čínidlem, který se složkami reaguje na barevné sloučeniny. Nebo se chromatogram pozoruje pod UV lampou, kdy se fluoreskující látky jeví jako světlé skvrny na tmavém pozadí.⁹

TLC se provádí na vrstvách:

- **nalévaných**, kde se využívá jemných práškových materiálů (5-50 μm), které se nanáší na podložku v suspenzi ve vhodném rozpouštědle a někdy s přídavkem pojidla (např.

sádra, rýžový škrob, želatina, atd.). Tyto vrstvy jsou určeny především pro kvalitativní i kvantitativní analýzu a většinou se dodávají komerčně, např. Silufol (silikagel s pojidlem na hliníkové fólii), Silufol UV 254 nebo 366 (ve vrstvě sorbentu obsahuje fluorescenční indikátor) nebo Lucefol (prášková celulóza na hliníkové fólii, bez pojidla).⁶

- **sypaných**, které jsou připravovány z adsorbentů použitelných pro chromatografii na malých sloupcích (40-70 μm), většinou se připravují v laboratoři a jsou určeny spíše pro preparativní chromatografii.^{8,6}

TLC má široké uplatnění při identifikaci a kvalitativním stanovení látek složitých směsí. Výhodou je jednoduché provedení, rychlé dělení látek, snadná detekce a mikrogramové množství analyzované směsi.⁵

2.6.2.2 Kolonová chromatografie

Při kolonové chromatografii se směs látek určených k dělení vnese na adsorbent v chromatografické trubici. Na kolonu se vlévá eluent, který z kolony vytéká s komponenty dělené směsi a nazývá se eluát. Eluát se jímá po frakcích do konstantního objemu.⁶

2.6.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

U HPLC nastává dělení analyzovaných látek mezi stacionární fází naplněnou v koloně a mobilní fází procházející kolonou za vysokého tlaku. Mobilní fáze je čerpána vysokotlakým čerpadlem, které umožňuje konstantní tok o malé rychlosti (0,1-10 ml/min) za vysokého tlaku (až 40 MPa). Zůstává-li složení mobilní fáze stále, jedná se o izokratickou eluci. Při gradientové eluci se k jedné mobilní fází plynule přimíchává rostoucí množství druhé mobilní fáze s větším elučním účinkem a tak se vytváří plynulý koncentrační gradient mobilní fáze. Dávkování vzorku je umožněno speciální injekční mikrostříkačkou, výhodnější je dávkování obtokovým dávkovacím kohoutem.^{5,9}

Kolony se používají pouze náplňové. Pro nižší tlaky jsou vhodné kolony z tlustého borosilikátového skla a pro vysoké tlaky (kolem 50 MPa) z nerezové oceli. Trubice jsou dlouhé 5-30 cm o vnitřním průměru 2-8 mm. Důležitá je kvalita sorbentu. Většinou se používají nemodifikované i chemicky modifikované mikročástice silikagelu nebo oxid hlinitý. Velký význam mají detektory pro HPLC, které by měly mít schopnost detekovat látky v roztoku v koncentracích ng až $\mu\text{g/ml}$. Mezi nejpoužívanější se řadí např. spektrofotometrický detektor, fluorimetrický, konduktometrický, amperometrický, hmotnostní spektrometr, aj.^{5,9}

2.6.3 Filtrace

Umožňuje oddělení pevné fáze od kapalné pomocí propustného pórovitého materiálu, který svými póry propustí pouze kapalinu (filtrát), zatímco pevné částice se zadrží. Rychlost tohoto procesu je závislá na velikosti filtrační plochy, velikosti pórů, typu filtrované látky, viskozitě rozpouštědla a přetlaku filtrované kapaliny. Nejčastěji používaná je filtrace za normálního tlaku, kdy se suspenze nalije na papírový filtr, který je ve skleněné nálevce a filtrát tak protéká působením gravitace. Filtrační papír se nehodí pro silně kyselé nebo alkalické roztoky. V tomto případě se dává přednost porézním destičkám ze slinutého skla frity (tzv. sintry) nebo skleněné vatě.^{6,7}

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

3.1 Všeobecné postupy

3.1.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Kvalitativní analýza obsahových látek extraktu květů javoru byla prováděna vzestupným způsobem na deskách Silufol UV 254 v chromatografické komoře, která byla nasycena parami mobilní fáze.

3.1.2 Odpařování rozpouštědel tekutých extraktů

Ether se odpařil díky vysoké těkavosti samovolně při pokojové teplotě. Ethanol byl z extraktu odpařován za sníženého tlaku (1,6 kPa) a teploty kolem 50 °C na vakuové rotační odparce.

3.1.3 Příprava Sephadexu pro sloupcovou chromatografii

Sephadex LH-20 byl ponořen v 80% ethanolu a 2 hodiny bobtnal za občasného promíchání.

3.1.4 Sloupcová chromatografie

Chromatografická kolona byla připravena nalitím nabobtnalého Sephadexu do chromatografické kolony při současně mírně otevřeném odtoku a byla promyta 80% ethanolem. Následně byl na hladinu nanesen vzorek rozpuštěný v 80% ethanolu. Sloupcová chromatografie byla prováděna způsobem izokratické eluce.

3.2 Potřeby

3.2.1 Rozpouštědla

Aceton p.a., Penta

Butanol, Lachema

Diethylether p.a.

Ethanol

Chloroform, Penta

Methanol p.a., Penta

Voda destilovaná

3.2.2 Chemikálie

Difenylboryloxyethylamin (Flavognost)

Dimethylsulfoxid, Fluka

Folin-Ciocalteuovo činidlo, Sigma-Aldrich

Hexakynoželezitan draselný

Chlorid železitý

Kyselina chloristá

Kyselina mravenčí p.a., Lachema

Makrogol 300

Uhličitan sodný

Vanilin

3.2.3 Standardy

Apigenin, Sigma-Aldrich

Hesperetin, Koch-Light Laboratories

Hesperidin, Koch-Light Laboratories

Hyperosid, Sigma-Aldrich

Kempferol, Fluka

Kvercetin, Sigma-Aldrich

Kyselina ferulová, Serva, Feinbiochemie

Kyselina chlorogenová, Sigma-Aldrich

Kyselina kávová, Fluka

Kyselina oleanolová, Sigma-Aldrich

Kyselina rozmarýnová, Sigma-Aldrich

Kyselina skořicová, Sigma-Aldrich

Luteolin, Sigma-Aldrich

Rutin, Sigma-Aldrich

β -amyrin, Carl Roth GmbH

3.2.4 Detekční činidla

D1: Vanilinové činidlo - bylo připraveno vždy včas potřeby těsně před detekcí. 1% roztok vanilinu v 95% ethanolu se smíchal s 3% kyselinou chloristou v poměru 1:1. Chromatogram byl touto směsí postříkán a následně zahříván při teplotě 200 °C po dobu 7-9 minut. Pozitivní reakce se projevila vznikem různě barevných skvrn.

D2: Detekce na flavonoidy (Flavognost) - horká TLC vrstva byla postříkána roztokem difenylboroxyethylaminu R (10 g/l) v methanolu R a pak stejným objemem roztoku makrogolu 400 (50 g/l) v methanolu. Chromatogram se asi 30 minut sušil na vzduchu a pak byl prohlédnut pod UV lampou při vlnové délce 365 nm. Pozitivní reakce dává vznik různě fluoreskujícím skvrnám.³

D3: Detekce redukujících látek (fenoly, aminy, thiosířany a isothiokyanáty) – chromatogram byl postříkán směsí 1% hexakynoželezitanu draselného v ethanolu a 2% roztokem chloridu železitého v poměru 1:1. Po 5 minutách byly pozorovány modré nebo zelené skvrny.

D4: UV $\lambda=254$ nm - chromatogram byl prohlédnut pod UV lampou při vlnové délce 254 nm. Pozitivní reakce se projevila vznikem různě tmavých skvrn, ve kterých byl zhášen fluoreskující luminofor vrstvy chromatogramu.

D5: UV $\lambda=365$ nm - chromatogram byl prohlédnut pod UV lampou při vlnové délce 365 nm. Pozitivní reakce se projevila vznikem fluoreskujících skvrn různého zbarvení.

3.2.5 Chromatografické adsorbenty

Silufol UV 254 - TLC desky Aluminium sheets 20x20 cm, Silica gel 60 F254, Merck. Jedná se o silikagel s pojídlem na hliníkové folii obsahující ve vrstvě sorbetu zároveň fluorescenční indikátor umožňující detekci při 254 nm.

3.2.6 Vytvářecí soustavy pro chromatografii

chloroform-methanol 7:3

butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4

3.2.7 Přístroje

Digitální váhy analytické ADA

Digitální váhy KERN 572-33

Laboratorní vaříč Fisher Scientific

Ponorný mixér Novaline HB-150

Spectrophotometr Shimadzu UV-1601

Ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P Bandelin

UV lampa Camag 254/366 nm

Vakuová odparka Buchi Rotavapor R-114

3.3 Testovaný materiál

Květy *Acer platanoides* byly nasbírané v dubnu 2007 v Předměřicích u Hradce Králové. Sušeny byly při pokojové teplotě.

3.4 Izolace obsahových látek

3.4.1 Extrakce květů *Acer platanoides*

39,9995 g sušených květů *Acer platanoides* bylo rozmělněno v hladké třence s těrkou. Drť květů byla přenesena do Erlenmayerovy baňky a bylo přidáno 250 ml etheru tak, aby byl

celý obsah ponořen. Následně proběhla extrakce obsahových látek pomocí ultrazvuku při 20 °C po dobu 20 min a intenzitě 10. Nádoba byla uložena ve tmě přes noc. Druhý den byl etherový extrakt přefiltrován přes filtrační papír. Zbarvení extraktu bylo zelenožluté. Suchý extrakt byl získán samovolným odpařením etheru při pokojové teplotě po dvou dnech. Hmotnost získaného suchého etherového extraktu byla 0,5775 g.

Následně byl získán ethanolový extrakt. Nejprve bylo nutné vysušit drť květů *Acer platanoides* od etheru. Ten se samovolně odpařil v digestoři. Bylo přidáno 250 ml 65% ethanolu. Byla provedena vířivá extrakce pomocí ponorného mixéru po dobu 5 min. Obsah nádoby byl zfiltrován přes filtrační papír. Zbarvení tekutého extraktu bylo tmavě hnědé. Suchý extrakt byl získán odpařením ethanolu na vakuové odparce. Při odpařování docházelo ke značnému pění extraktu. Hmotnost získaného suchého ethanolového extraktu byla 4,5453 g.

3.4.2 Provedení tenkovrstvé chromatografie

3.4.2.1 Orientační zjištění obsahu redukujících látek pomocí vanilinového činidla

Na tenkou vrstvu folie Silufol UV 254 byly nanесeny 1% roztoky etherového a ethanolového extraktu a dva standardy:

1. etherový extrakt (rozpuštěný v 96% ethanolu)
2. ethanolový extrakt (rozpuštěný v 96% ethanolu)
3. kyselina chlorogenová (rozpuštěná v acetonu)
4. kvercetin (rozpuštěný v acetonu).

Jako vyvíjecí soustava byla zvolena směs chloroform-methanol 7:3 v nasycené komoře. Chromatogram byl pozorován pod UV-lampou při vlnové délce 254 a 365 nm. Bylo zde patrné rozdělení obsahových látek. Kyselina chlorogenová zůstala na startu (nevhodná vyvíjecí soustava). Kvercetin nebyl obsažen v žádném z extraktů - byly zde rozdílné retenční faktory. Prokázání redukujících látek umožnilo vanilinové detekční činidlo. Po postříkání chromatogramu tímto činidlem a po následném zahřátí chromatogramu na teplotu 200 °C po dobu 8 minut došlo ke vzniku pozitivní reakce. Byly zde patrné různě barevné skvrny (obr. 47).

Obr. 47: Chromatogram - orientační zjištění redukujících látek (vanilinové činidlo)

Vyvíjecí soustava: chloroform-methanol 7:3

Detekce: D1 - vanilinové činidlo

Komora: nasycená



4 2 1 3

3.4.2.2 Tenkovrstvá chromatografie – standardy I.

Na tenkou vrstvu byly nanášeny 1% roztoky obou extraktů *Acer platanoides* a osm standardů.

1. etherový extrakt (rozpuštěný v 96% ethanolu)
2. ethanolový extrakt (rozpuštěný v 96% ethanolu)
3. kvercetin (rozpuštěný v acetonu)
4. rutin (rozpuštěný v dimethylsulfoxidu)
5. kempferol (rozpuštěný v acetonu)
6. kyselina chlorogenová (rozpuštěná v acetonu)
7. kyselina rozmarýnová (rozpuštěná v 96% ethanolu)
8. kyselina kávová (rozpuštěná v acetonu)
9. kyselina oleanolová (rozpuštěná v acetonu)
10. β -amyrin (rozpuštěný v acetonu)

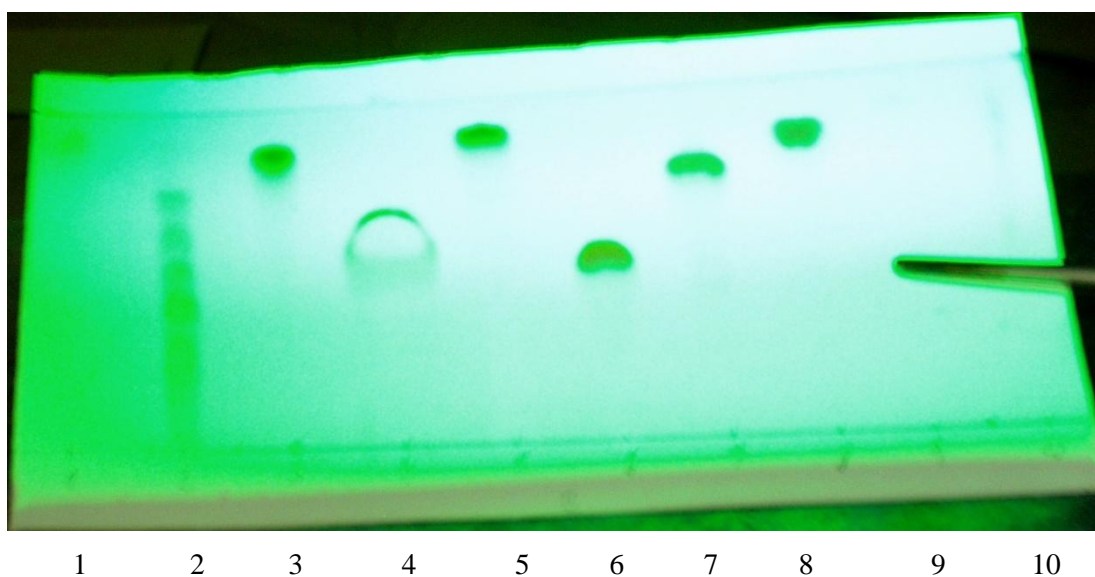
Byly připraveny 2 stejné chromatogramy. Jako vyvíjecí soustava byla zvolena butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4 v nasycené komoře. Jeden z chromatogramů byl prohlédnut pod UV lampou při vlnových délkách 254 (obr. 48) a 365 nm (obr. 49). Následně byl postříkán detekčním činidlem D2 (Flavognost) a po 30 minutách prohlédnut pod UV lampou při vlnové délce 365nm (obr. 50). Tento chromatogram byl dále detekován na obsah redukujících látek pomocí vanilinového činidla (obr. 51). Zde nedošlo k pozitivní reakci zřejmě z důvodu předchozího použití činidla D2. Druhý chromatogram byl testován na obsah redukujících látek (fenoly, aminy, thiosíranu a isothiokyanáty) pomocí detekčního činidla D3. Reakce byla pozitivní, u standardů a též u obou extraktů došlo ke vzniku modrých skvrn (obr. 52).

Obr. 48: Chromatogram – standardy I.

Vyvíjecí soustava: butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4

Detekce: D4 - UV $\lambda=254$ nm

Komora: nasycená

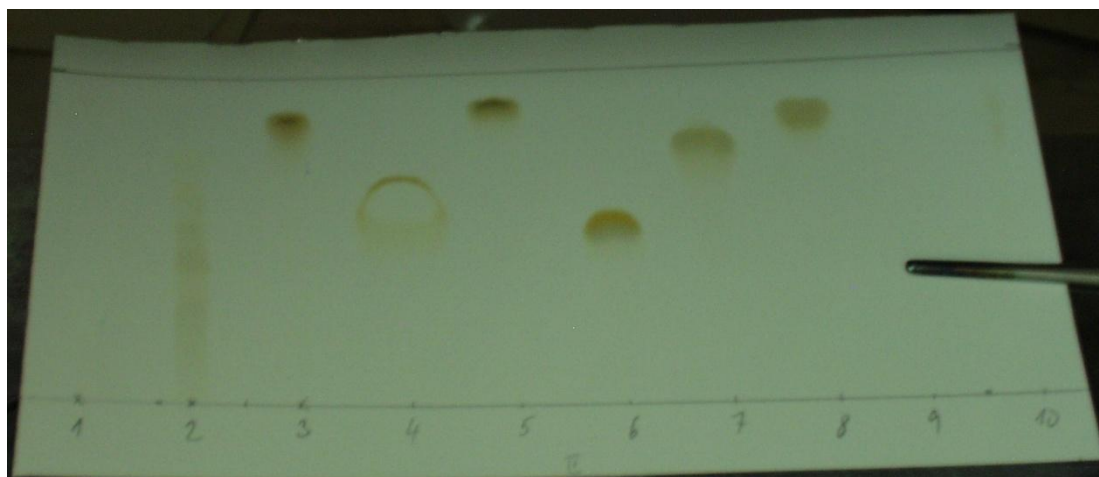


Obr. 49: Chromatogram – standardy I.

Vyvíjecí soustava: butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4

Detekce: D5 - UV $\lambda=365$ nm

Komora: nasycená



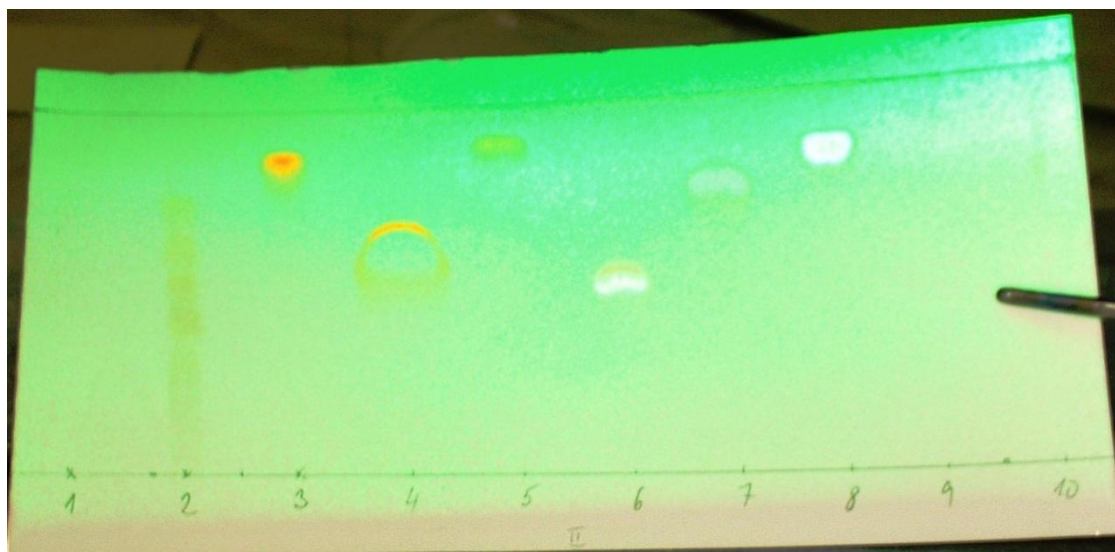
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Obr. 50: Chromatogram – standardy I.

Vyvíjecí soustava: butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4

Detekce: D2 - detekce na flavonoidy (Flavognost)

Komora: nasycená



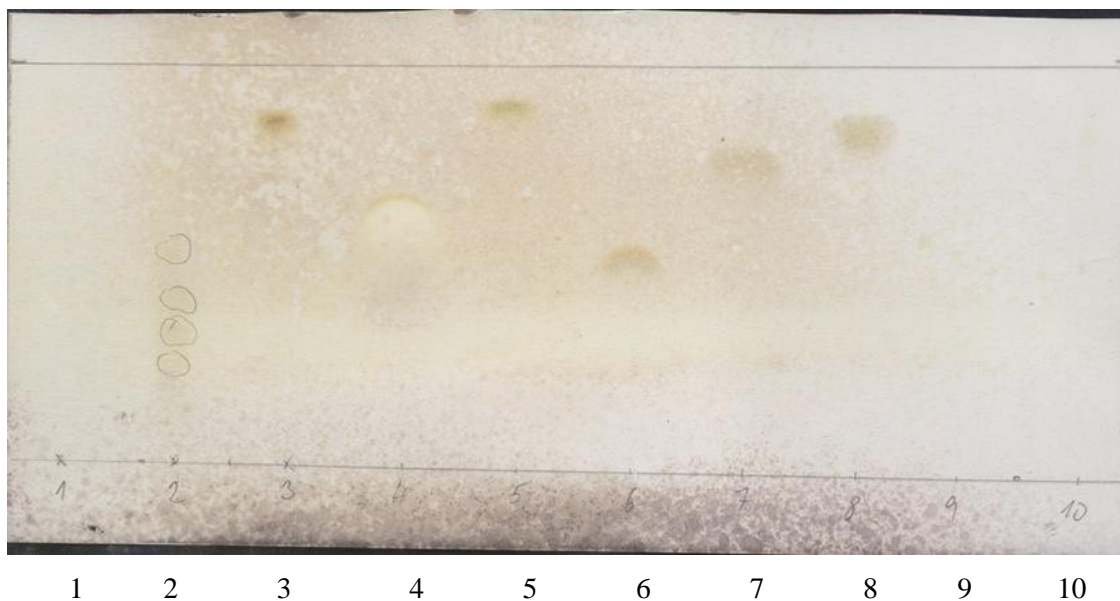
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Obr. 51: Chromatogram – standardy I.

Vyvíjecí soustava: butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4

Detekce: D1 - vanilinové činidlo

Komora: nasycená

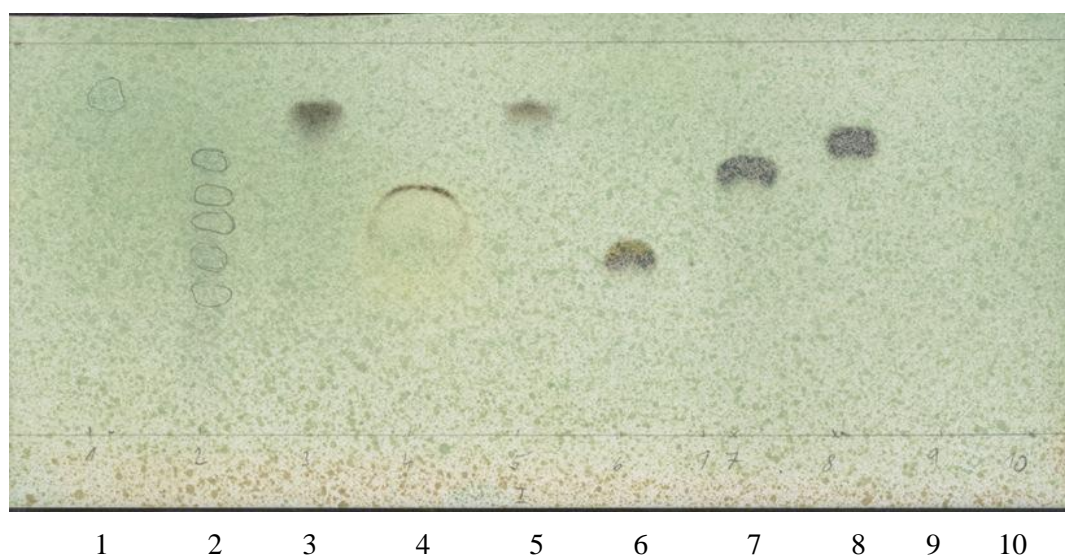


Obr. 52: Chromatogram – standardy I.

Vyvíjecí soustava: butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4

Detekce: D3 - detekce redukujících látek (fenoly, aminy, thiosířany a isothiokyanáty)

Komora: nasycená



3.4.2.3 Tenkovrstvá chromatografie - standardy II.

V předchozím experimentu nebyly standardy v extraktech jednoznačně prokázány, proto byly zvoleny další standardy a byly rovněž připraveny jejich 1% roztoky. Na tenkou vrstvu Silufolu UV 254 byly naneseny:

1. etherový extrakt (rozpuštěný v 96% ethanolu)
2. ethanolový extrakt (rozpuštěný v 96% ethanolu)
3. kyselina skořicová (rozpuštěná v acetonu)
4. luteolin (rozpuštěný v acetonu)
5. apigenin (rozpuštěný v dimethylsulfoxidu)
6. rutin (rozpuštěný v dimethylsulfoxidu)
7. hesperetin (rozpuštěný v acetonu)
8. hesperidin (rozpuštěný v dimethylsulfoxidu)

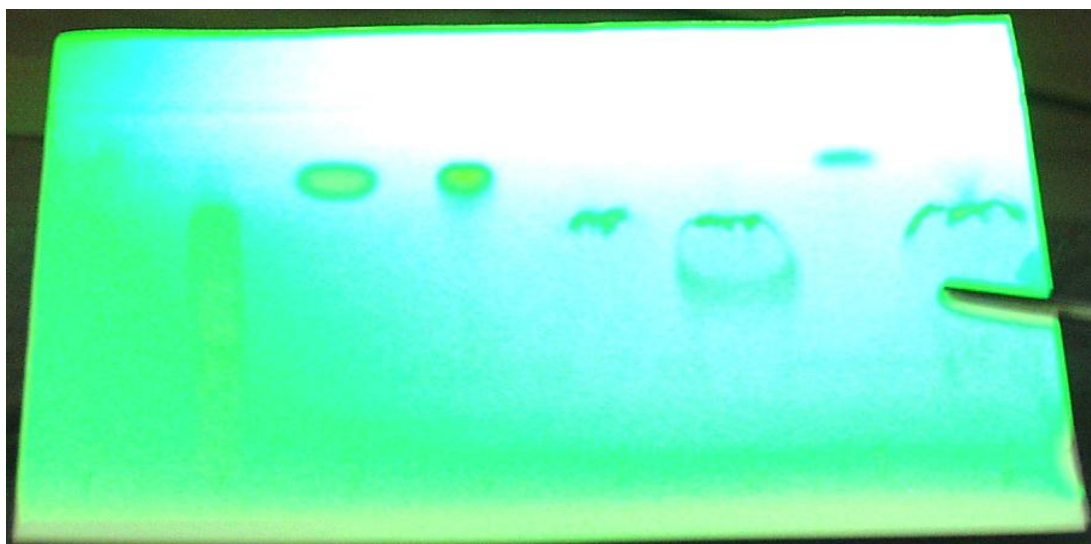
Byly rovněž připraveny 2 stejné chromatogramy, které byly vyvíjeny v nasycené komoře v soustavě butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4. Jeden z chromatogramů byl prohlédnut pod UV-lampou při 254 (obr. 53) a 365 nm (obr. 54). Dále byl postříkán činidlem D2 (Flavognost) a po 30 minutách prohlédnut pod UV-lampou při 365 nm (obr. 55). Tento chromatogram byl následně testován na obsah redukujících látek pomocí vanilinového činidla D1. Reakce nebyla pozitivní, zřejmě z důvodu předchozího použití činidla D2 (obr. 56). Druhý chromatogram byl zkoušen na obsah redukujících látek pomocí činidla D3. Detekce byla pozitivní. U standardů a též u obou extraktů došlo ke vzniku modrých skvrn (obr. 57).

Obr. 53: Chromatogram – standardy II.

Vyvíjecí soustava: butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4

Detekce: D4 - UV $\lambda=254$ nm

Komora: nasycená



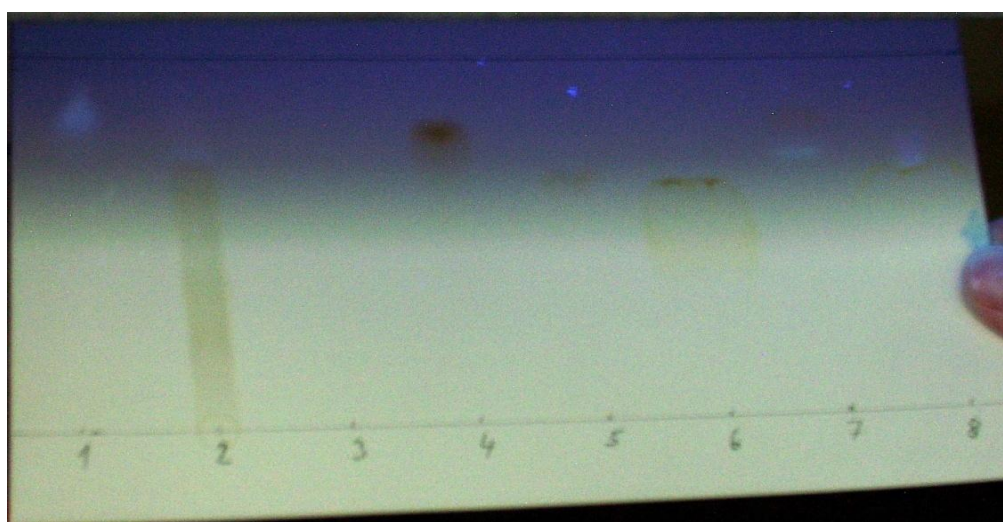
1 2 3 4 5 6 7 8

Obr. 54: Chromatogram – standardy II.

Vyvíjecí soustava: butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4

Detekce: D5 - UV $\lambda=365$ nm

Komora: nasycená



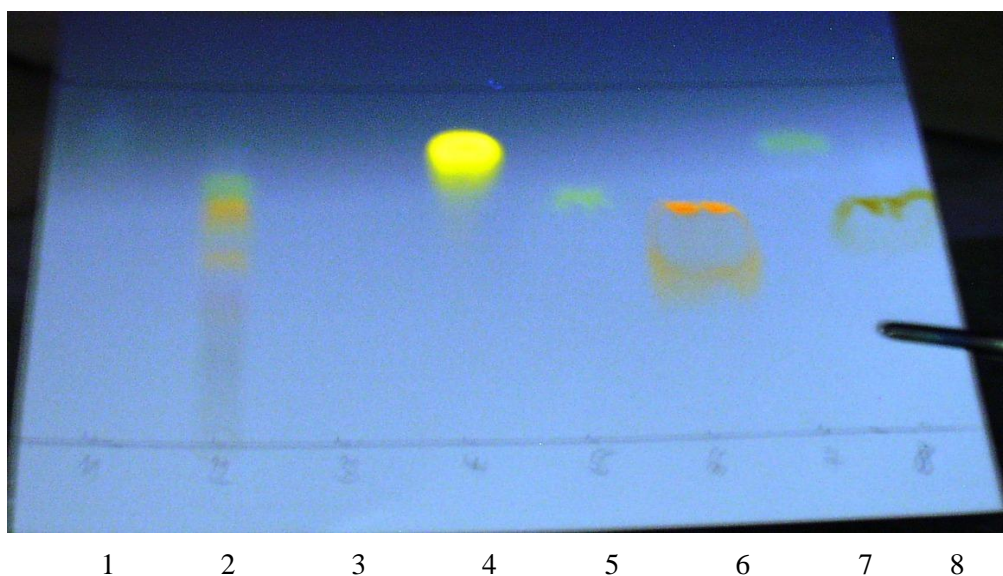
1 2 3 4 5 6 7 8

Obr. 55: Chromatogram – standardy II.

Vyvíjecí soustava: butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4

Detekce: D2 - detekce na flavonoidy (Flavognost)

Komora: nasycená

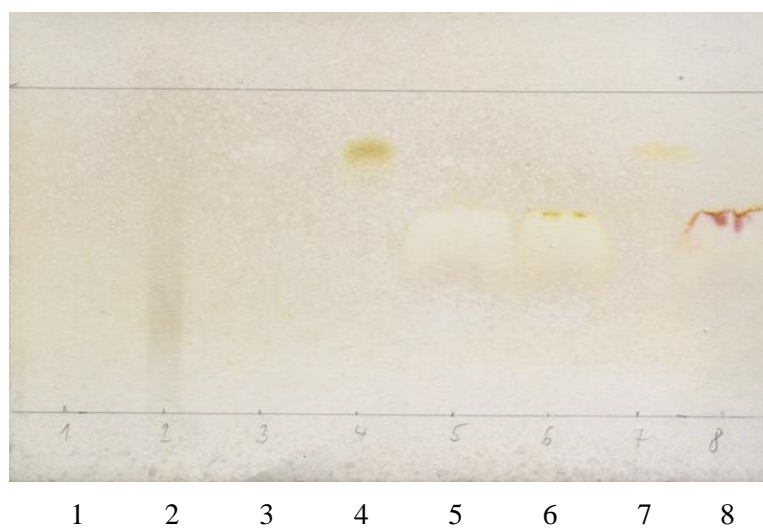


Obr. 56: Chromatogram – standardy II.

Vyvíjecí soustava: butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4

Detekce: D1 - vanilinové činidlo

Komora: nasycená

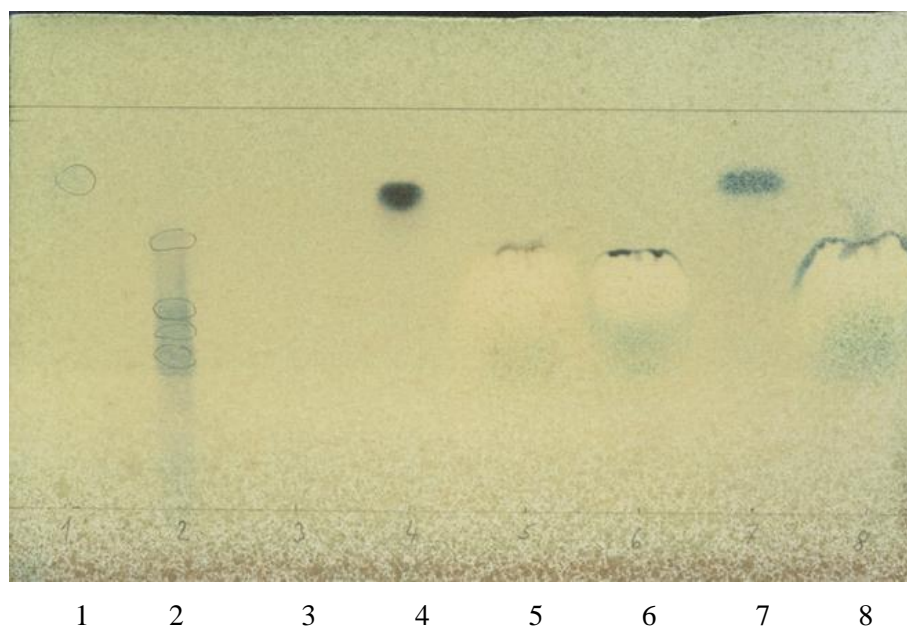


Obr. 57: Chromatogram – standardy II.

Vyvíjecí soustava: butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4

Detekce: D3 - detekce redukujících látek (fenoly, aminy, thiosířany a isothiokyanáty)

Komora: nasycená



3.4.2.4 Tenkovrstvá chromatografie – standardy III.

Na tenkou vrstvu folie Silufol UV 254 byly naneseny 1% roztoky obou extraktů *Acer platanoides*, šest standardů již testovaných a dva další standardy (kyselina ferulová a hyperosid).

1. Etherový extrakt (rozpuštěný v 96% ethanolu)
2. Ethanolový extrakt (rozpuštěný v 96% ethanolu)
3. Kyselina chlorogenová (rozpuštěná v acetonu)
4. Kyselina rozmarýnová (rozpuštěná v 96% ethanolu)
5. Kyselina kávová (rozpuštěná v acetonu)
6. Apigenin (rozpuštěný v acetonu)
7. Rutin (rozpuštěný v acetonu)
8. Hesperetin (rozpuštěný v acetonu)
9. Kyselina ferulová (rozpuštěná v 96% ethanolu)
10. Hyperosid (rozpuštěný v 96% ethanolu)

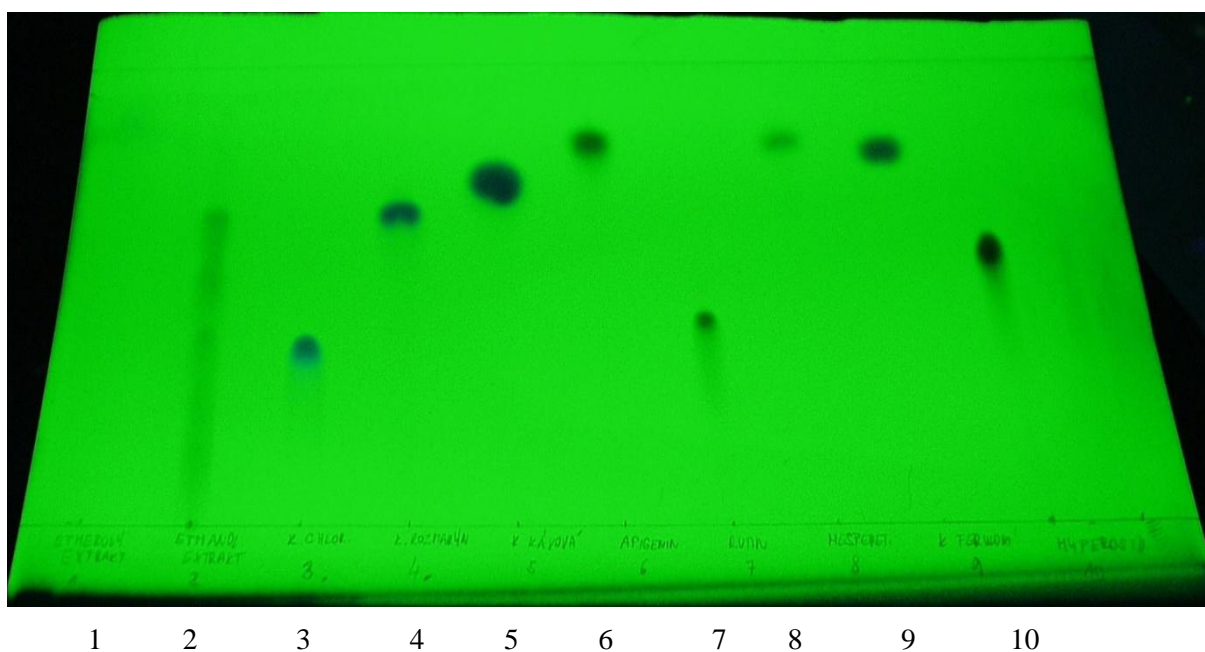
Jako vyvíjecí soustava byla rovněž zvolena butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4 v nasycené komoře. Chromatogram byl prohlédnut pod UV lampou při vlnové délce 254 nm (obr. 58) a 365 nm (obr. 59). Chromatogram byl následně postříkán vanilinovým činidlem (obr. 60).

Obr. 58: Chromatogram – standardy III.

Vyvíjecí soustava: butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4

Detekce: D4 - UV $\lambda=254$ nm

Komora: nasycená



Obr. 59: Chromatogram – standardy III.

Vyvíjecí soustava: butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4

Detekce: D5 - UV $\lambda=365$ nm

Komora: nasycená



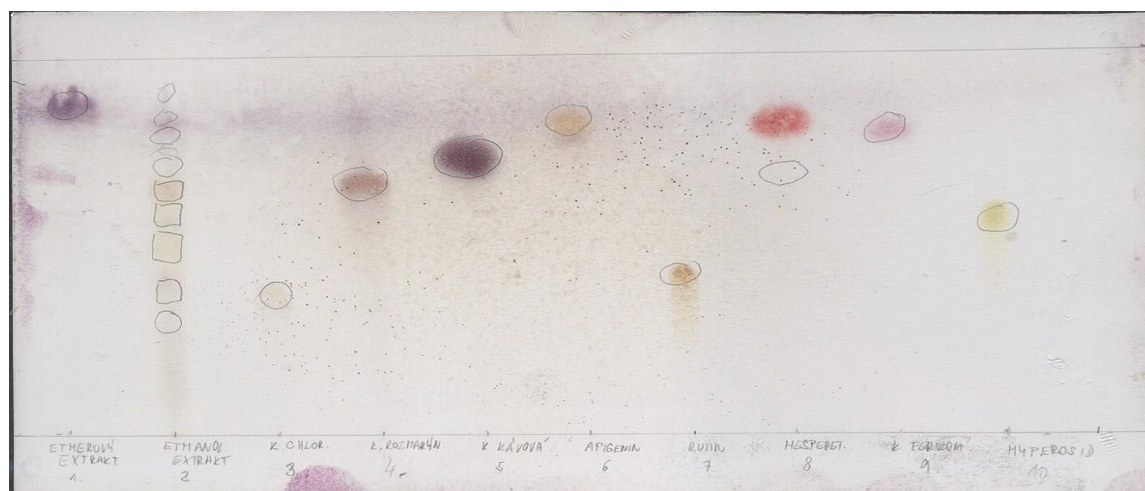
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Obr. 60: Chromatogram – standardy III.

Vyvíjecí soustava: butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4

Detekce: D1 - vanilinové činidlo

Komora: nasycená



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

3.4.3 Orientační sloupcová chromatografie ethanolového extraktu *Acer platanoides* na sloupci Sephadexu

0,0025 g ethanolového extraktu *Acer platanoides* bylo děleno na sloupci Sephadexu LH-20. Délka kolony byla 15 cm a průměr kolony 1,5 cm. Na kolonu byl ethanolový extrakt nanesen ve formě 0,5% roztoku v 80% ethanolu. Kolona byla vymývána 80% ethanolom. Extrakt se na tomto sloupci nedělil. Získaný eluát byl rozdělen na čtyři frakce, které měly světle zelenou barvu.

Následně byla provedena TLC analýza získaných frakcí. Jako mobilní fáze byla použita butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4. Nedošlo k žádnému dělení obsahových látek. Zřejmě byly všechny látky zachyceny na Sephadexu.

3.4.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) - prokázání rutinu

V ethanolovém extraktu květů *Acer platanoides* byla snaha stanovit rutin pomocí kapalinového chromatografu Philips PU4100 s detektorem ECOM LCD 2083. Analýza složek probíhala na koloně Merck Purospher Star RP-18e (250 mm x 4 mm, velikost částic 5 μm). Mobilní fázi tvořil 50% methanol a jednalo se o izokratickou eluci. Průtok byl 1 ml/min, vlnová délka byla 350 nm.

Kalibrační křivka byla sestrojena ze 3 analýz na každé ze 3 koncentračních úrovní. (obr. 61). Rovnice přímky: $Y=167055 * X$, $r=0,992297$

Obr. 61: Kalibrační křivka

Mon, 1st Dec, 2008 8:23:31

RUTIN08

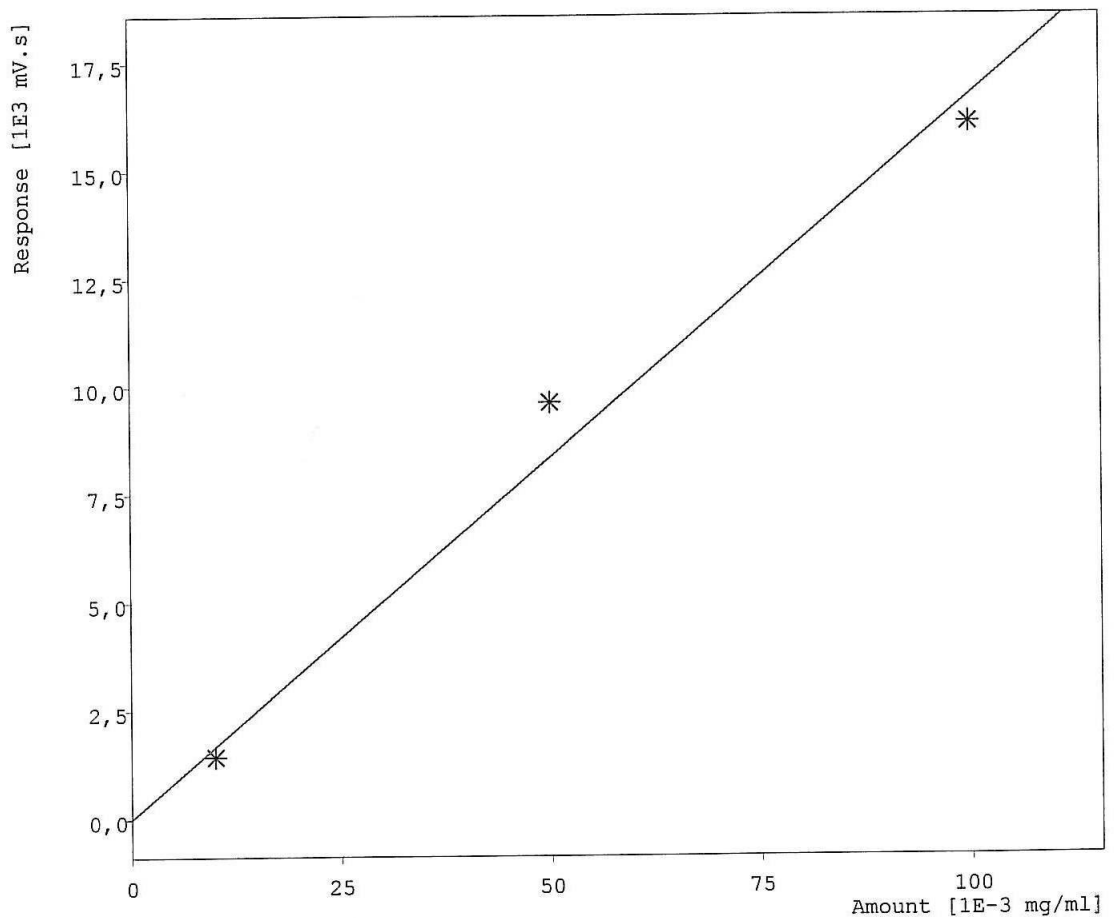
Page 1

rutin - 10,355 min.

Substance Levels

Lv	Response	Amount	Lvl Res Factor
1	16094,8358	1,000E-01	6,2E-06
2	9622,3407	5,000E-02	5,2E-06
3	1429,5235	1,000E-02	7,0E-06
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

Peak Type : **Ordnr**
 Left Window : **0,5 min.**
 Right Window : **0,5 min.**
 Response Base : **Area**
 Curve Fit Type : **Linear**
 Zero Type : **Curve from Zero**
 Subst. Equation : **$Y = 167055 * X$**
 Correlation Coef. : **0,992297**
 Saved Resp. Fact. : **0,000005986**



Směrodatná odchylka jednotlivých analýz se pohybovala kolem 3,5 %.

Pomocí HPLC analýzy byl prokázán rutin ve vzorku ethanolového extraktu *Acer platanoides* (1 mg/ml), hmotnostní procenta činila 1,72 % (obr. 62).

Obr. 62: HPLC analýza - prokázání rutinu ve vzorku ethanolového extraktu květů

Acer platanoides

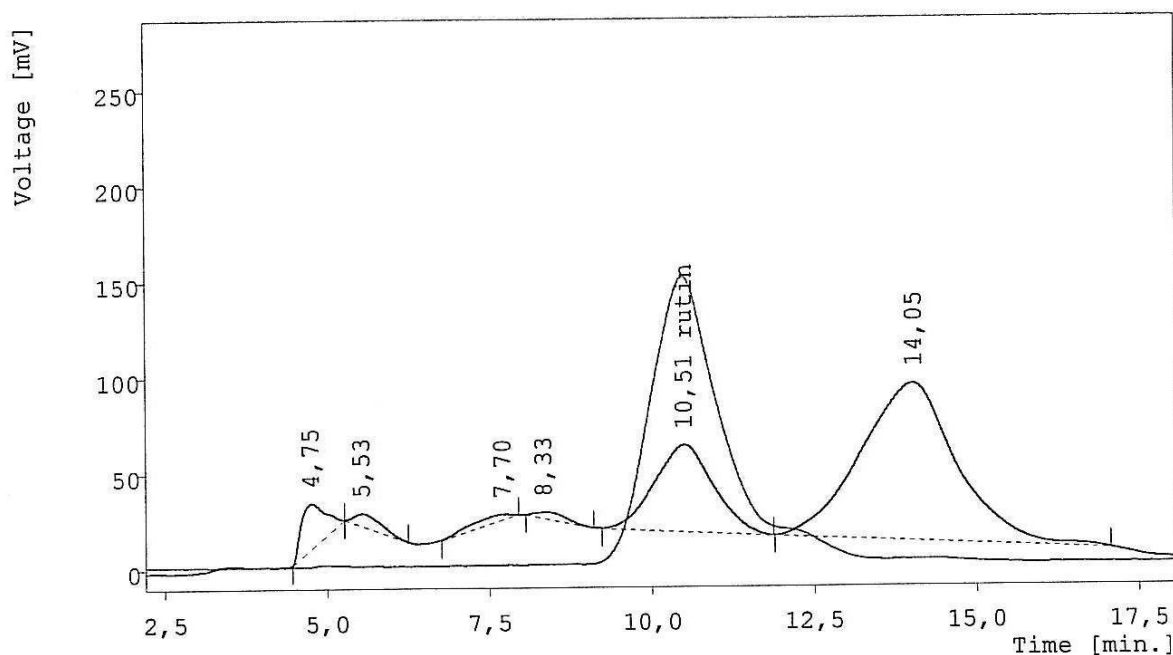
Mon, 1st Dec, 2008 8:28:54

FLA20-1

Pag

Sample ID : **Flaonoidy, 350nm**
 Sample : **vzorek, 1mg/ml MeOH**
 Raw Data : **fla20-1**
 Primary : **fla20-1**
 Project : **flav**

Analyst : **Rejlova**
 From : **Thu, 27th Nov, 2008 14:22:57**
 Calibration : **rutin08**
 Style : **report**



Result Table - Calculation Method ESTD

Peak No.	Reten. time	Area [mV.s]	Amount [%hm]	Amount [%]	Peak Type	Component Name
1	4,753	612,1224	0,0000	0,000		
2	5,533	201,6226	0,0000	0,000		
3	7,700	162,5535	0,0000	0,000		
4	8,333	113,2288	0,0000	0,000		
5	10,507	2874,2220	1,7205	100,000	Ordnr	rutin
6	14,047	8372,4263	0,0000	0,000		
-	Total	12336,1757	1,7205	100,000		

3.4.5 Stanovení celkového obsahu fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteuovy metody

Celkový obsah fenolických látek v ethanolovém extraktu květů *Acer platanoides* byl měřen pomocí Folin-Ciocalteuovy metody a výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny gallové. Absorbance ethanolového extraktu (1 mg/ml) byla měřena po 30 minutách při vlnové délce 765 nm. Měření proběhlo 3 krát.

Celkový obsah fenolických látek byl odečten z kalibrační křivky pomocí UV Probe softwaru a byl vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové, tj. 0,135 mg GAE/ mg suchého ethanolového extraktu květů *Acer platanoides* (tabulka 1).

Tabulka 1: Celkový obsah fenolických látek v ethanolovém extraktu

	1. měření (mg GAE/mg extraktu)	2. měření (mg GAE/mg extraktu)	3. měření (mg GAE/mg extraktu)	Průměr (mg GAE/mg extraktu)
Ethanolový extrakt <i>Acer platanoides</i> (1 mg/ml)	0,146	0,113	0,145	0,135

3.5 Biologická aktivita

3.5.1 Stanovení antioxidační aktivity

3.5.1.1 Metoda sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu

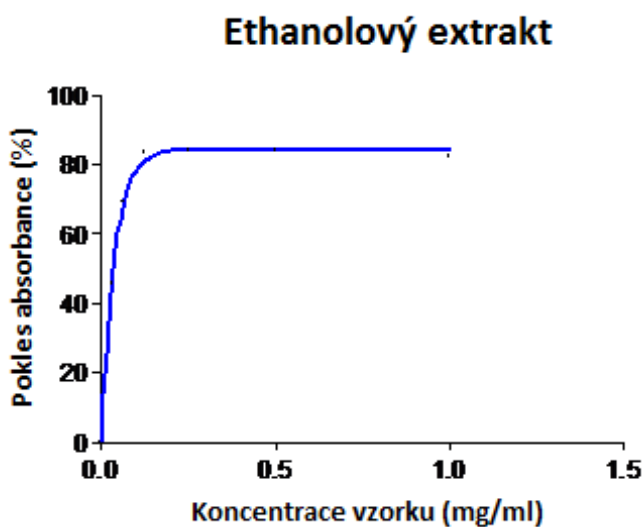
Antioxidační aktivita ethanolového extraktu *Acer platanoides* byla měřena metodou sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu. Absorbance vzorků (byly připraveny koncentrace 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml a 0,0313 mg/ml) byla měřena vždy 3 krát při vlnové délce 525 nm a byla vypočítána průměrná hodnota absorbance. Antioxidační účinek byl vyjádřen v procentech poklesu absorbance oproti slepému vzorku:

$$\frac{C_{\text{prům.vzorku}}}{C_{\text{prům.DPPH}}} \times 100 = X$$
$$100 - X$$

Tabulka 2: Měření antioxidační aktivity

	1.měření absorbance	2.měření absorbance	3.měření absorbance	Průměr	X	100-X
DPPH	0,5018	0,4926	0,4804	0,0313		
Vzorek 1 mg/ml	0,0816	0,0843	0,0901	0,0853	17,35	82,65
Vzorek 0,5 mg/ml	0,0771	0,0798	0,0794	0,0788	16,03	83,97
Vzorek 0,25 mg/ml	0,0738	0,0761	0,0841	0,0780	15,87	84,13
Vzorek 0,125 mg/ml	0,0814	0,0827	0,0790	0,0810	16,48	83,52
Vzorek 0,0625 mg/ml	0,1479	0,1525	0,1508	0,1504	30,59	69,41
Vzorek 0,0313 mg/ml	0,2667	0,2678	0,2647	0,2664	54,19	45,81

Ethanolový extrakt vykazoval významnou antioxidační aktivitu. Naměřené EC₅₀ bylo 0,034 mg/ml.

Graf 1: Závislost poklesu absorbance (%) na koncentraci vzorku (mg/ml)

Naměřené hodnoty absorbance pro etherový extrakt v DPPH testu byly příliš vysoké, proto s nimi nebylo dále počítáno.

4 DISKUZE A VÝSLEDKY

Rostliny čeledi *Aceraceae* jsou bohatým zdrojem fenolických látek. Dobře prostudované jsou především javory rostoucí ve východní Asii a Japonsku. Např. z kůry *Acer nikoense* byly izolovány diarylheptanoidy, kumarinolignany a další fenolické látky, které vykazovaly silnou antioxidační, antialergickou, protinádorovou a vazorelaxační aktivitu.^{14,15,28} Antioxidační aktivitu měly také kumarinolignany cleomiscosin A a C izolované z listů *Acer okamotoanum* a vitexin izolovaný z *Acer palmatum*.^{25,23} Protinádorovou aktivitu měl *Acer truncatum*, jehož hlavními obsahovými látkami jsou flavonoidy.³⁶ Předmětem výzkumu jsou též severoamerické javory, a to především *Acer saccharum* a z něj získávaný javorový sirup. Z xylému *Acer saccharum* byly izolovány kumarinolignany cleomiscosin C a cleomiscosin D, které svou antioxidační aktivitou předčily vitamín C.¹³ Také javorový sirup je zdrojem fenolických látek, které mají dobré antioxidační, antiradikálové a antimutagenní vlastnosti.¹⁶ Na našem území se hojně vyskytují tři javory: *Acer pseudoplatanus* (javor klen), *Acer platanoides* (javor mléč) a *Acer campestre* (javor babyka).⁴

V této rigorózní práci jsme se zaměřili na druh *Acer platanoides*. Cílem bylo izolovat a identifikovat obsahové látky z květů *Acer platanoides*. Dle dostupných informací jsou hlavními obsahovými látkami rostlin čeledi *Aceraceae* látky fenolické povahy. Proto jsme předpokládali, že budou obsaženy i v *Acer platanoides*.

Nejdříve byla provedena extrakce obsahových látek květů *Acer platanoides*. Etherový extrakt byl získán ponořením 39,9995 g nadrcených usušených květů do etheru a extrakce proběhla pomocí ultrazvuku. Zbarvení extraktu bylo zelenožluté a získaná hmotnost suchého extraktu byla 0,5775 g. Ethanolový extrakt byl získán za použití vířivé extrakce. K drti květů (vysušené od předchozího použití etheru) byl přidán 65% ethanol a byla provedena vířivá extrakce za použití ponorného mixéru a po přefiltrování byl získán tmavě hnědý extrakt. Suchý extrakt byl získán odpařením na vakuové odparce. Odpařování bylo značně problematické. Neustále docházelo k pění extraktu. Toto pění bylo zřejmě způsobeno přítomností saponinů. Hmotnost suchého ethanolového extraktu byla 4,5453 g.

Oba suché extrakty byly dále využity na analýzu obsahových látek. Nejdříve byla provedena orientační zkouška na přítomnost redukujících látek pomocí vanilinového činidla. Na tenkou vrstvu byly nanášeny 1% roztoky etherového extraktu, ethanolového extraktu a dva standardy (kyselina chlorogenová a kvercetin). Jako vyvíjecí soustava byla zvolena směs

chloroform-methanol 7:3 v nasycené komoře. Pod UV-lampou bylo patrné rozdělení látek v obou extraktech. Prokázání redukujících látek umožnilo vanilinové činidlo D1. Na chromatogramu byly patrné fialové skvrny. V etherovém extraktu byla jedna výrazná fialová skvrna, v ethanolovém extraktu tři fialové skvrny a ostatní byly žluté (obr. 47). Vyvíjecí soustava nebyla vhodná. Kyselina chlorogenová zůstala na startu.

Na základě pozitivní reakce extraktů s vanilinovým činidlem byla provedena TLC obou extraktů a osmi standardů (kvercetin, rutin, kempferol, kyselina chlorogenová, kyselina rozmarýnová, kyselina kávová, kyselina oleanolová a β -amyrin). Jako vyvíjecí soustava byla zvolena butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4 v nasycené komoře. Byly připraveny dva chromatogramy. Triterpenoidní standardy kyselina oleanolová a β -amyrin zůstaly na startu, vyvíjecí soustava pro ně nebyla vhodná. Pod UV-lampou při 254 nm bylo patrné rozdělení obsahových látek v ethanolovém extraktu (oddělené tmavé skvrny), v etherovém extraktu byla zřetelná jedna tmavá skvrna (obr. 48). Po porovnání retenčních faktorů jsme předpokládali, že v ethanolovém extraktu byl obsažen rutin a kyselina chlorogenová. Chromatogram pod UV-lampou při 365 nm nevykazoval pozitivní reakci (obr. 49). Chromatogram byl následně postříkán Flavognostovým detekčním činidlem a po 30 minutách prohlédnut pod UV-lampou při vlnové délce 365 nm. Dle literatury, kyselina chlorogenová fluoreskuje po postříkání tímto činidlem světle modře, rutin žlutohnědě, kvercetin oranžově a kempferol žlutozeleně.^{3,8} Standardy rutin, kvercetin, kyselina chlorogenová a kempferol dávaly stejnou fluorescenci dle literatury, ale v extraktech žádná skvrna výrazně nefluoreskovala (obr. 50). Chromatogram byl dále postříkán vanilinovým činidlem D1 (obr. 51). Reakce nebyla pozitivní, došlo ke zkreslení výsledků zřejmě z důvodu předchozího použití činidla D2 (Flavognost). Druhý chromatogram byl použit na detekci redukujících látek (fenoly, aminy, thiosířany a isothiokyanáty) pomocí činidla D3. Reakce byla pozitivní. Na chromatogramu byly patrné tmavě modré skvrny standardů. V ethanolovém extraktu byly rozlišitelné modré skvrny, v etherovém extraktu byla detekována jedna modrá skvrna (obr. 52). Etherový a ethanolový extrakt obsahoval látky redukující povahy, byly předpokládány především fenolické látky.

Detekce standardů v extraktech v předchozím experimentu nebyla jednoznačná, proto byly vybrány další standardy. Na tenkou vrstvu byly naneseny 1% etherový extrakt, 1% ethanolový extrakt a standardy kyselina skořicová, luteolin, apigenin, rutin, hesperetin a hesperidin. Vyvíjení probíhalo opět v soustavě butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4 v nasycené komoře a byly připraveny dva chromatogramy. Kyselina skořicová zůstala na

startu. Při detekci pod UV-lampou při 254 nm bylo patrné rozdělení látek v ethanolovém extraktu, v etherovém extraktu byla obsažena pouze jedna tmavá skvrna (obr. 53). Při detekci pod UV-lampou při 365 nm byla patrná jedna světle modrá skvrna v etherovém extraktu a dvě světle modré skvrny v ethanolovém extraktu (obr. 54). Ostatní skvrny v ethanolovém extraktu byly tmavé. Po porovnání retenčních faktorů jsme předpokládali, že v ethanolovém extraktu byl obsažen apigenin, rutin a hesperetin. Při detekci Flavognostem dává apigenin špinavě žlutooranžovou skvrnu, luteolin žlutou a rutin žlutohnědou.^{3,8} V ethanolovém extraktu byly patrné tři oranžově fluoreskující skvrny a jedna žlutá. V etherovém extraktu byla patrná jedna světle modře fluoreskující skvrna (obr. 55). Po porovnání retenčních faktorů a fluorescence skvrn jsme předpokládali přítomnost apigeninu a rutinu. Použití vanilinového činidla nebylo účinné z důvodu předchozího postříkání chromatogramu Flavognostovým činidlem. Druhý chromatogram byl rovněž detekován na přítomnost redukujících látek pomocí činidla D3 (obr. 57). Reakce byla pozitivní. Na chromatogramu byly patrné tmavě modré skvrny standardů, několik tmavě modrých skvrn v ethanolovém extraktu a jedna modrá skvrna v etherovém extraktu. Etherový a ethanolový extrakt obsahoval látky redukující povahy, byly předpokládány především fenolické látky.

Podle výsledků dvou předchozích experimentů byly vybrány standardy flavonoidů, které vykazovaly přítomnost v ethanolovém extraktu, a byla provedena TLC analýza v soustavě butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4 v nasycené komoře. Na tenkou vrstvu byly nanесeny 1% roztoky etherového, ethanolového extraktu a standardy kyselina chlorogenová, kyselina rozmarýnová, kyselina kávová, apigenin, rutin, hesperetin a dva další standardy kyselina ferulová a hyperosid. Chromatogram byl prohlédnut pod UV-lampou při 254 nm (obr. 58). V ethanolovém extraktu bylo patrné rozdělení na několik tmavých skvrn, v etherovém extraktu byla pouze jedna skvrna. Po porovnání retenčních faktorů jsme předpokládali přítomnost kyseliny chlorogenové a rutinu. Pod UV-lampou při vlnové délce 365 nm (obr. 59) standardy světle modře fluoreskovaly (kyselina chlorogenová, kyselina rozmarýnová, kyselina kávová, hesperetin a kyselina ferulová) nebo tvořily tmavé skvrny (apigenin, rutin a hyperosid). V etherovém extraktu byla přítomná jedna světle modře fluoreskující skvrna, v ethanolovém extraktu byla jedna světle modře fluoreskující skvrna se stejným retenčním faktorem jako hesperetin a dále několik tmavých skvrn. Předpokládali jsme přítomnost rutinu a hyperosidu. Po postříkání vanilinovým činidlem D1 došlo ke vzniku různě barevných skvrn. Především v etherovém extraktu byla patrná výrazně fialová skvrna.

Po porovnání všech tří experimentů jsme předpokládali, že v ethanolovém extraktu byly obsaženy flavonoidy rutin, apigenin, hesperetin, hyperosid a fenolická kyselina - kyselina chlorogenová. Etherový extrakt obsahoval pouze jednu látku redukující povahy, jejíž vlastnosti byly prokázány vanilinovým činidlem D1 a činidlem D3.

Dále byla provedena orientační sloupcová chromatografie ethanolového extraktu *Acer platanoides* na sloupci Sephadexu LH-20. Extrakt se na tomto sloupci nedělil. Získaný eluát byl rozdělen na čtyři frakce, které měly světle zelenou barvu. Byla provedena TLC analýza ve vyvíjecí soustavě butanol-kyselina mravenčí-voda 5:1:4 v nasycené komoře. Nedošlo k žádnému dělení obsahových látek. Zřejmě zůstaly všechny obsahové látky zachyceny na Sephadexu.

Pomocí HPLC analýzy byla dokázána přítomnost rutinu v ethanolovém extraktu květů *Acer platanoides*, hmotnostní koncentrace činila 1,72 %.

Celkový obsah fenolických látek v ethanolovém extraktu byl vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové. Naměřená hodnota byla 0,135 mg kyseliny gallové na mg suchého ethanolového extraktu květů *Acer platanoides*.

Dále byly testovány antioxidační vlastnosti ethanolového extraktu metodou sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí pomocí DPPH radikálu. Antioxidační účinek byl vyjádřen v procentech poklesu absorbance oproti slepému vzorku. Ethanolový extrakt vykazoval vysokou antioxidační aktivitu. Naměřená EC_{50} byla 0,034 mg/ml. Předpokládali jsme, že se na vysoké antioxidační aktivitě ethanolového extraktu květů *A. platanoides* podílely látky fenolické povahy. Naměřené hodnoty absorbance pro etherový extrakt v DPPH testu byly příliš vysoké, proto s nimi nebylo dále počítáno.

Také v extraktu listů *Acer platanoides* byl stanoven vysoký obsah polyfenolických látek (330,44 % kyseliny gallové), který dokonce převyšoval obsah polyfenolických látek v extraktu ze zeleného čaje (312,54 % kyseliny gallové). Extrakt z listů *A. platanoides* měl rovněž vysoké hodnoty při měření antioxidační aktivity. Z výsledků vyplynulo, že vysoký antioxidační účinek extraktu souvisel s přítomností nedefinovaných polyfenolických látek.³⁰

5 SOUHRN

V první části práce byla provedena extrakce obsahových látek květů *Acer platanoides*. Byly připraveny dva extrakty – etherový a ethanolový. Identifikace obsahových látek proběhla pomocí tenkovrstvé chromatografie za použití standardů fenolických látek. Podle výsledků TLC byla v ethanolovém extraktu předpokládána přítomnost rutinu, apigeninu, hesperetinu, hyperosidu a kyseliny chlorogenové. V etherovém extraktu byla přítomna jedna látka redukující povahy. HPLC analýza potvrdila přítomnost rutinu v ethanolovém extraktu. Byl stanoven celkový obsah fenolických látek v ethanolovém extraktu, který byl vyjádřen jako ekvivalent kyseliny gallové, tj. 0,135 mg GAE/ mg extraktu.

Druhá část práce byla zaměřena na testování antioxidační aktivity ethanolového extraktu pomocí DPPH testu. Byly naměřeny vysoké hodnoty antioxidační aktivity. Předpokládali jsme, že se na antioxidační aktivitě ethanolového extraktu podílely látky fenolické povahy.

Extraction of compounds from flowers *Acer platanoides* was carried out in the first part of our work. Two extracts have been prepared - ether and ethanol. Identification of the compounds was done by the help of a thin layer chromatography with using the standards of phenolic compounds. According to the results TLC the presence of rutin, apigenin, hesperetine, hyperoside and chlorogenic acid were supposed. The presence of a compound of reducing character was proved in the ether extract. The HPLC analysis confirmed the presence of rutin in the ethanol extract. Further, the content of total phenolic compounds was determined in the ethanol extract and results were expressed as gallic acid equivalent, i.e. 0,135 mg GAE/mg of extract.

The second part of our work was aimed at testing antioxidant activity of ethanol extract by help of DPPH test. Very high values of antioxidant activity have been measured. Compounds of phenolic character were supposed to participate in antioxidant activity of ethanol extract.

6 LITERATURA

1. Slavík, B., Chotek, J. jn., Tomšovic, P.: Květena České republiky 5. díl. Academia, Praha, 1997, 571 stran
2. Renner, S.S., Beenken L., Grimm, G.W., Kocyan, A., Ricklefs, R.E.: The evolution of dioecy, heterodichogamy, and labile sex expression in *Acer*. *Evolution*, Vol. 61, Issue 11, 2007, pp. 2701-2719
3. Ministerstvo zdravotnictví České republiky: Český lékopis 2002 (ČL 2002). Díl 3, Evropská část III = Pharmacopoea Bohemica MMII (Ph. B. MMII). Grada, 2002, Strany 2396-3711
4. Úradníček L.: Javor-dřevina roku 2003: Hradec Králové, 11. září 2003. Česká lesnická společnost, Praha, 2003, 36 stran
5. Karlíček, R., a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty. Karolinum, Praha, 2007, 281 stran
6. Opletal, L.: Fytochemické metody. Karolinum, Praha, 1994, 142 stran
7. Hrabálek, A.: Chemická a laboratorní technika pro farmaceuty. Karolinum, Praha, 2007, 132 stran
8. Gasparič, J., Churáček, J.: Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin. Státní nakladatelství technické literatury, Praha, 1981, 320 stran
9. Klouda, P.: Moderní analytické metody. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, 2003, 132 stran
10. Takano, H.: Investigation of chemical and physical properties of Southwestern Wisconsin maple syrup. *Journal of Student Research, Food and Nutritional Sciences*, 2006, pp. 97-107
11. Paradkar, M. M., Sivakesava, S., Irudayaraj, J.: Discrimination and classification of adulterants in maple syrup with the use of infrared spectroscopic techniques. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 83, Issue 7, 2003, pp. 714-721
12. Abou-Zaid, M.M., Nozzolillo, C., Tonon, A., Coppens, M., Lombardo, D.: High-performance liquid chromatography characterization and identification of antioxidant polyphenols in maple syrup. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 46, Issue 1, 2008, pp. 117-125
13. Shigenobu, A., Kazuko, Y., Toshihiro, I.:
<http://www.ipdl.inpit.go.jp/> Strojový překlad z japonštiny (získáno 17. 7. 2008)

14. Akazawa, H., Akihisa, T., Taguchi, Y., Banno, N., Yoneima, R., Yasukawa, K.: Melanogenesis inhibitory and free radical scavenging activities of diarylheptanoids and other phenolic compounds from the bark of *Acer nikoense*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 29, No. 9, 2006, pp. 1970-1972
15. Iizuka, T., Nagumo, S., Yotsumoto, H., Moriyama, H., Nagai, M.: Vasorelaxant effects of *Acer nikoense* extract and isolated coumarinolignans on rat aortic rings. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 30, No. 6, 2007, pp. 1164-1166
16. Thériault, M., Caillet, S., Kermasha, S., Lacroix, M.: Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. *Food chemistry*, Vol. 98, Issue 3, 2006, pp. 490-501
17. Štípek, S., a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Grada, Praha, 2000, 314 stran
18. Silva, M. M., Santos, M. R., Caroco, G., Rocha, R., Justino, G., Mira, L.: Structure - antioxidant activity relationships of flavonoids: A re-examination. *Free Radical Research*, Vol. 36, No. 11, 2002, pp. 1219-1227
19. Trna, J., Táborská, E.: Přírodní polyfenolové antioxidanty: www.med.muni.cz/biochem/seminare/prirantiox.rtf (získáno 29. 6. 2008)
20. Racek, L.: *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. Galén, Praha, 2003, 89 stran
21. Paulová, H., Bochoráková, H., Táborská, E.: Metody stanovení antioxidantní aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chemické listy*, No. 98, 2004, s. 174-179
22. Jahodář, L., *Farmakobotanika : semenné rostliny*. Karolinum, Praha, 2006, 258 s.
23. Kim, J.H., Lee, B.Ch.: The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*. *Archives of pharmacal research*, Vol. 28, No. 2, 2005, pp. 195-202
24. Yang, H., Sung, S.H., Kim, Y.Ch.: Two new hepatoprotective stilbene glycosides from *Acer mono* leaves. *Journal of Natural Products*, Vol. 68, No. 1, 2005, pp. 101-103
25. Jin, W.Y., Thuong, P.T., Su, N.D., Min, B.S., Son, K.H., Chang, H.W.: Antioxidant activity of cleomiscosins A and C isolated from *Acer okamotoanum*. *Archives of pharmacal research*, Vol. 30, No. 3, 2007, pp. 275-281
26. Yang, H., Lee, M.K., Kim, Y.C.: Protective activities of stilbene glycosides from *Acer mono* leaves against H₂O₂ - induced oxidative damage in primary cultured rat hepatocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 53, No. 10, 2005, pp. 4182-6
27. Okabe, S., Suganuma, M., Imayoshi, Y., Taniguchi, S., Yoshida, T., Fujiki, H.: New TNF- α releasing inhibitors, geraniin and corilagin, in leaves of *Acer nikoense*,

- Megusurino-ki. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 24, No. 10, 2001, pp. 1145-1148
28. Morikawa, T., Tao, J., Ueda, K., Matsuda, H., Yoshikawa, M.: Structures of new aromatic constituents and inhibitors of degranulation in RBL-2H3 cells from a Japanese folk medicine, the stem bark of *Acer nikoense*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 51, No. 1, 2003, pp. 62-67
 29. Kupchan, S.M., Hemingway, R. J., Knox, J.R., Barboutis, S.J., Werner, D., Barboutis, M.A.: Tumor inhibitors XXI. Active principles of *Acer negundo* and *Cyclamen persicum*. *Journal of pharmaceutical sciences*, Vol. 56, Issue 5, 2006, pp. 603-608
 30. Dluhošová, K., Pšenáková, I.: Antioxidačné účinky vybraných sekundárných metabolitov. *Nová Biotechnologica*, 2004, str. 185-197
 31. Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., Trinajstić, N.: Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica chemica acta*, Vol. 76, No. 1, 2003, pp. 55-61
 32. Polášek, M., Skála, P., Opletal, L., Jahodář, L.: Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, Vol. 379, 2004, pp. 754-758
 33. Singleton, V.L., Rossi, J.A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology of Viticulture*, Vol. 16, 1965, pp. 144-158
 34. Han, S.S., Lo, S.C., Choi, Y., Kim, J.H., Baek, S.H.: Antioxidant activity of crude extract and pure compounds of *Acer ginnala* Max. *Bulletin of the Korean Society*, Vol. 25, No. 3, 2004, pp. 389-391
 35. Ma, X., Tian, W., Wu, L., Cao, W., Ito, Y.: Isolation of quercetin-3-O-L-rhamnoside from *Acer truncatum* Bunge by high-speed counter-current chromatography. *Journal of chromatography A*, Vol. 1070, Issues 1-2, 2005, pp. 211-214
 36. Zhao, W., Zhang, J., Wang, Z., Zhang, Y., Tian, W.: The extract of leaves of *Acer truncatum* Bunge: A natural inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, Vol. 21, No. 5, 2006, pp. 589-596
 37. Fossen, T., Andersen, O.M.: Cyanidin 3-(2'',3''-digalloylglucoside) from red leaves of *Acer platanoides*. *Phytochemistry*, Vol. 52, Issue 8, 1999, pp. 1697-1700
 38. Tomko J. a kol.: *Farmakognózia : učebnica pre farmaceutické fakulty*. Osvěta, Martin, 1999, 422 stran

39. Bartoš, P.: Japonské javory. Grada, Praha, 2007, 80 stran
40. Hyoung, J.K., Woo, E.R., Shin, C.G., Park, H.: A new flavonol glycoside gallate ester *Acer okamotoanum* and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) integrase. *Journal of natural products*, 61, 1998, pp. 145-148
41. Obrázek květu *Acer platanoides*: <http://botanika.wendys.cz/kytky/foto.php?503:4>
(získáno 16. 11. 2008)
42. Bruneton, J.: *Pharmacognosy : phytochemistry medicinal plants*. Andover, Hampshire, 1999, 1119 stran