

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



**MĚĎ REDUKUJÍCÍ ÚČINKY FLAVONŮ**  
**COPPER REDUCING EFFECTS OF FLAVONES**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Konzultant: PharmDr. Jana Karličková, Ph.D.

Hradec Králové, 2015

Mgr. Markéta Jeřábková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením PharmDr. Jany Karličkové, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 15.1.2015

Mgr. Markéta Jeřábková

## PODĚKOVÁNÍ

Především bych ráda poděkovala PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. za odborné vedení rigorózní práce, pomoc při experimentálním měření v laboratoři, za trpělivost, cenné rady, připomínky a konzultace při zpracovávání této práce.

Dále bych chtěla poděkovat Doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za poskytnuté materiály, návody k vypracování grafů při zpracovávání experimentální práce a za konzultaci dané problematiky.

Mé poděkování také patří Katedře farmaceutické botaniky a ekologie za poskytnutí laboratoře pro naměření mých výsledků do rigorózní práce a vstřícné jednání. Tato rigorózní práce vznikla za podpory grantů: GAUK 1220314B a FRVŠ 664/2011/A a výzkumného programu PRVOUK P-40.

## OBSAH

<b>1. Úvod.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Cíl práce .....</b>	<b>7</b>
<b>3. Teoretická část.....</b>	<b>8</b>
3.1. Volné radikály a oxidační stres.....	8
3.2. Měď v lidském organismu.....	9
3.2.1. Farmakokinetika mědi .....	10
3.2.2. Biologický význam mědi .....	10
3.3. Flavonoidy .....	11
3.3.1. Účinky flavonoidů .....	12
3.3.2. Antioxidační účinky flavonoidů .....	12
3.3.3. Protizánětlivé účinky flavonoidů.....	13
3.3.4. Prooxidační účinky flavonoidů.....	13
3.4. Flavony .....	13
3.4.1. Mosloflavon.....	14
3.4.2. Luteolin.....	14
3.4.3. Apigenin .....	15
3.4.4. Chrysin.....	15
3.4.5. Diosmin .....	16
3.4.6. 5-hydroxyflavon .....	16
3.4.7. Baikalein.....	17
3.4.8. Baikalin.....	17
3.4.9. Negletein.....	18
3.4.10. Apigenin-7-glukosid .....	18
<b>4. Experimentální část .....</b>	<b>19</b>
4.1. Materiál.....	19
4.2. Přístrojové vybavení .....	19
4.3. Chemikálie.....	19
4.4. Testované látky.....	20
4.5. Příprava zásobních a pracovních roztoků .....	20
4.6. Kalibrace měďnatých iontů .....	22
4.7. Metodický postup stanovení redukce měďnatých iontů v pufru.....	24
4.8. Statistická analýza .....	26

<b>5. Výsledky</b> .....	<b>27</b>
5.1. Kalibrační křivka .....	27
5.2. Redukční aktivita testovaných flavonů.....	28
5.2.1. Redukční aktivita mosloflavonu .....	29
5.2.2. Redukční aktivita luteolinu.....	31
5.2.3. Redukční aktivita apigeninu .....	34
5.2.4. Redukční aktivita chrysinu .....	36
5.2.5. Redukční aktivita diosminu .....	38
5.2.6. Redukční aktivita 5-hydroxyflavonu .....	41
5.2.7. Redukční aktivita negleteinu .....	43
5.2.8. Redukční aktivita baikaleinu .....	46
5.2.9. Redukční aktivita baikalinu .....	49
5.2.10. Redukční aktivita apigenin-7-glukosidu .....	52
5.2.11. Redukční aktivita při pH 4.5.....	54
5.2.12. Redukční aktivita při pH 5.5.....	56
5.2.13. Redukční aktivita při pH 6.8.....	58
5.2.14. Redukční aktivita při pH 7.5.....	60
<b>6. Diskuze</b> .....	<b>62</b>
<b>7. Závěr</b> .....	<b>67</b>
<b>8. Seznam použitých zkratek</b> .....	<b>68</b>
<b>9. Použitá literatura</b> .....	<b>69</b>
<b>10. Abstrakt</b> .....	<b>73</b>
<b>11. Abstract</b> .....	<b>74</b>

## 1. Úvod

Tato práce navazuje na diplomovou práci a pokračuje ve výzkumu flavonoidů měřeními a porovnáváním jejich chelatační aktivity.

Měď patří do skupiny stopových prvků. O její potřebě dnes již nejsou pochybnosti. Je nezbytnou součástí našeho organismu. Její denní příjem je malý, pohybuje se pouze v miligramovém množství. Nejčastěji je v organismu součástí různých proteinů, které plní enzymatickou funkci.

V našem organismu běžně vznikají reaktivní formy kyslíku a dusíku avšak ve vyšších koncentracích mohou být příčinou oxidačního stresu. Jejich nadměrná tvorba souvisí s celou řadou onemocnění a právě v této souvislosti hledáme účinné antioxidanty. Flavonoidy, sekundární metabolity rostlin, vykazují antioxidační aktivitu, která vede ke snižování volných radikálů různými mechanismy.

Flavonoidy jsou přirozeně se vyskytující fenolické sloučeniny, které jsou studovány zejména pro své antioxidační účinky. Jsou známy i svými dalšími vlastnostmi jako je antiproliferativní, antimikrobní a antialergický účinek nebo protizánětlivá aktivita. Jsou také spojovány s poklesem výskytu kardiovaskulárních a neurodegenerativních chorob. Flavonoidy za určitých podmínek mohou mít prooxidační aktivitu, která může vést k produkci radikálů.

## 2. Cíl práce

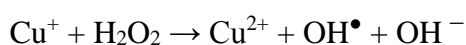
Cílem této rigorózní práce je změřit redukční aktivitu vybraných flavonů (mosloflavon, luteolin, apigenin, chrysin, diosmin, 5-hydroxyflavon, baikalein, baikalin, negletein, apigenin-7-glukosid) při různých pato/fyziologicky významných pH a převést ji do grafů, následně uvést statistickou významnost zpracovanou pomocí Bonferroniho post testu. Na závěr je třeba u testovaných flavonů odvodit vztahy mezi strukturou hodnocených látek a jejich schopností redukovat měďnaté ionty.

### 3. Teoretická část

#### 3.1. Volné radikály a oxidační stres

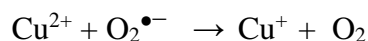
Částice se nazývá volný radikál, pokud atom nebo molekula obsahuje alespoň jeden orbital s nepárovým elektronem. Většina biomolekul nejsou radikály, protože obsahují orbitály plně obsazené dvěma elektrony. Obecně platí, že radikály jsou vysoce reaktivní částice, protože se snaží si doplnit párový elektron a tak jsou schopné rychle se navázat na jinou strukturu nebo elektron předat jiné molekule či jí ho odejmout. Vznik radikálu může být iniciací celého řetězce dalších reakcí. V organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (ROS) a reaktivních forem dusíku (RNS). Tyto částice mají značný fyziologický i patogenetický význam a mohou působit i toxicky (Štípek 2000). Ve fyziologických koncentracích se uplatňují ve funkci intracelulárních posílů (Daiber et al. 2013). Pokud se však volných radikálů nahromadí v organismu velké množství, může docházet k poškození důležitých biomolekul (Mira et al. 2002), tkání, následně k buněčné smrti nebo se mohou rozvinout různé choroby (Singh et al. 2014).

Mezi nejznámější reaktivní formy kyslíku patří superoxid  $O_2^\bullet$  a hydroxylový radikál  $HO^\bullet$ , z reaktivních forem dusíku to jsou oxid dusnatý  $NO^\bullet$  a oxid dusičitý  $NO_2^\bullet$ . Mezi nejvíce prostudovaný patří  $NO^\bullet$ , který působí jako významný vasodilatátor (Daiber et al. 2013). Peroxid vodíku není radikálem, účastní se však jeho vzniku. Reakce samotného peroxidu vodíku s biomolekulami jsou pomalé, ale v přítomnosti přechodných kovů (dvojmocné železo  $Fe^{2+}$  nebo jednomocná měď  $Cu^+$ ) se peroxid vodíku pohotově redukuje podle rovnice 1. Touto Fentonovou reakcí vzniká vysoce toxický hydroxylový radikál (Štípek 2000). Ionty železa ( $Fe^{2+}$ ) nebo mědi ( $Cu^+$ ), které katalyzují Fentonovu reakci se mohou tvořit v přítomnosti superoxidového radikálu (Rovnice 2) nebo i jiného biologického redukčního činidla jako kyselina askorbová nebo glutathion (Jomova a Valko 2011).



Rovnice 1. Fentonova reakce





## Rovnice 2. Redukce mědi

Přechodné kovy jako měď a železo se tedy významně účastní vzniku reaktivních forem kyslíku, jen pokud nejsou vázány v bezpečných depozitních formách, jako je železo ve feritinu a transferinu nebo měď v ceruloplazminu (Štípek 2000). Volné radikály se mohou zapojit do nepříznivých reakcí, jako je modifikace proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Jejich kumulace vede k oxidačnímu stresu a poškození buňky (Bertinato a Abbé 2004).

Oxidační stres vzniká nadměrnou tvorbou reaktivních forem kyslíku a dusíku nebo poklesem antioxidantní obrany organismu. Neboli oxidační stres je relativní převaha ROS a RNS nad antioxidantní kapacitou. Oxidační stres významně přispívá ke vzniku nádorů, působí mutace DNA, poškozuje makromolekuly a tkáně (Holeček 2010). Kardiovaskulární a neurodegenerativní choroby jsou typickým projevem oxidačního stresu (Daiber et al. 2013).

Antioxidantní ochranný systém organismu je komplexní a zahrnuje nespočet mechanismů, například odstranění superoxidu superoxidodismutázou (SOD) a peroxid vodíku katalázou nebo řadu dalších neenzymových vylučovačů (vitamin E a vitamin C). Dále to může být již zmíněné skladování iontů kovů v depozitních proteinech (Fisher a Naughton 2005).

### ***3.2. Měď v lidském organismu***

Každý živý organismus se skládá z biogenních prvků, což jsou uhlík, vodík, kyslík a dusík. Další nezbytné prvky jsou minerální látky. V řádově nižších koncentracích se v lidském těle nacházejí stopové prvky (Kudlová et al. 2009). Měď je esenciální stopový prvek nezbytný pro širokou škálu buněčných a molekulárních procesů (Wijmenga a Klomp 2004). Obsah mědi v organismu je asi 80-120 mg. Její denní přísun potravou je přibližně 2,5 mg/den (Masopust a Průša 1999).

Homeostáza mědi je definována jako kontrola rovnováhy mezi její nezbytností a toxicitou. Zahrnuje různé mechanismy jako vychytávání, distribuce, skladování a exkrece (Wijmenga a Klomp 2004).

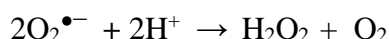
### **3.2.1. Farmakokinetika mědi**

Z trávicího ústrojí člověka se denně vstřebá asi 1 mg tohoto prvku a stejné množství se vyloučí žlučí. Absorbovaná měď se naváže v plazmě na albumin a přenese se do jater. Hepatocyty syntetizují glykoprotein ceruloplazmin, jehož molekula naváže šest atomů mědi. V této formě je ceruloplazmin uvolněn do plazmy a měď je předána podle potřeby různým tkáním, kde se inkorporuje do jiných proteinů a enzymů. Ceruloplazmin v těle váže asi 95 % tělesné mědi (Štípek 2000). Jen malé množství mědi zůstane vázáno na albumin a to může mít vliv na toxicitu tohoto prvku (Barceloux 1999).

### **3.2.2. Biologický význam mědi**

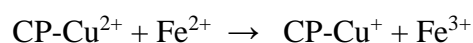
Měď se v organismu uplatňuje jako nedílná součást některých enzymů konkrétně jako kofaktor. Kofaktory jsou vyžadovány v mnoha rozmanitých biologických procesech (Bertinato a Abbé 2004). Zrovna tak může být měď vzniklá v redoxních reakcích příčinou tvorby nebezpečných reaktivních radikálů a oxidačního stresu a vést k poškození lipidů, proteinů a nukleových kyselin (Ding et al. 2011). Oxidační poškození DNA je spojováno se vznikem rakoviny, stárnutím, neurodegenerativními chorobami nebo kardiovaskulárními nemocemi (Perron a Brumaghim 2009).

Měď je součástí superoxiddismutázy (SOD), která hraje zásadní roli v antioxidační ochraně organismu proti volným radikálům (Wijmenga a Klomp 2004). Pomocí superoxiddismutázy (Rovnice 3) se odstraňuje superoxidový radikál (Jomova a Valko 2011).



Rovnice 3. Působení superoxiddismutázy

Další uplatnění mědi je v transportu železa. Sloučenina mědi ceruloplazmin má ferroxidázovou aktivitu. Ceruloplazmin (CP) je tedy nutný k oxidaci dvojmocného železa na trojmocné bez vedlejší produkce ROS (Rovnice 4). Oxidace železa je podmínkou pro přesun železa ze zásob na transferin. Měď hraje důležitou úlohu v udržování homeostázy železa (Štípek 2000), je taktéž důležitá pro syntézu hemu a absorpci železa (Barceloux 1999).

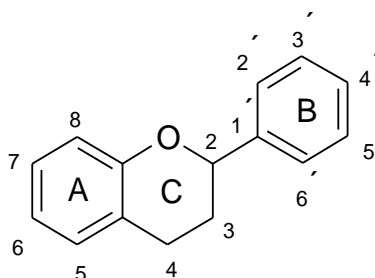


Rovnice 4. Oxidace železa

### 3.3. Flavonoidy

Flavonoidy reprezentují velkou skupinu polyfenolových sloučenin. Jsou to všudypřítomné sekundární metabolity rostlin, které jsou neoddělitelnou součástí naší stravy (Říha et al. 2014). Jejich průměrný denní příjem tvoří okolo 3 až 70 mg v závislosti na druhu a složení lidské stravy (Manach et al. 1997). Zdroj z potravy a biologická dostupnost flavonoidů jsou silně ovlivněny druhem rostliny, jejím růstem, sezónou, světlem, zralostí nebo typem přípravy pokrmu (Aherne a O'Brien 2002).

Jejich základním skeletem je fenylochroman (Obr. 1), který vytváří mnoho substitucí na obou benzenových kruzích (Pekal et al. 2011). Mnoho *in vitro*, *in vivo* výzkumů a některé epidemiologické studie ukazují široké spektrum biologických účinků podporujících zdraví (Říha et al. 2014).



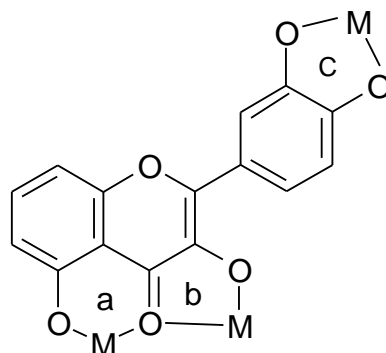
Obrázek 1. Základní struktura flavonoidů

### 3.3.1. Účinky flavonoidů

Nejvíce farmakologických účinků flavonoidů je spojováno s antioxidačním potenciálem (Sugihara et al. 1999). Flavonoidům jsou připisovány i jiné biologické účinky jako antialergická, protizánětlivá, antibakteriální, antivirová, antifungální, antiprotozoální, spasmolytická, protinádorová a imunomodulační aktivita (Singh et al. 2014). K dalším jejich účinkům můžeme řadit antiaterogenní, antiosteoporotický a hepatoprotektivní účinek (Silva et al. 2002).

### 3.3.2. Antioxidační účinky flavonoidů

Mnoho metabolických cest může vytvářet vysoce reaktivní hydroxylový radikál nebo jiné ROS a RNS a tento stav je kontrolován antioxidačními mechanismy (Perron a Brumaghin 2009). Flavonoidy jsou přírodními antioxidanty, které působí mechanismem přímého vychytávání volných radikálů v závislosti na volných hydroxylových skupinách. Nebo mohou chelatovat ionty přechodných kovů (měď, železo) a tím snižovat jejich možnost účastnit se reakcí vedoucí ke vzniku radikálů (Yao et al. 2004). Tvorba chelátu (Obr. 2) se může uskutečňovat mezi 5-hydroxyskupinou a 4-karbonylovou skupinou, další chelatační místo je mezi 3-hydroxyskupinou a karbonylovou skupinou v poloze 4 nebo může k navázání mědi dojít mezi hydroxylovými skupinami v poloze 3' a 4' na kruhu B. Dalším antioxidačním mechanismem je inhibice enzymů podílejících se na tvorbě ROS například enzym xantinoxidáza (XO), NADPH-oxidáza, lipoxygenáza (Mladěnka et al. 2010). XO je schopna produkce superoxidového radikálu a účastní se v mnoha patologických procesech jako zánět, virová infekce nebo vznik nádoru (Singh et al. 2014).



Obrázek 2. Schopnost flavonoidu chelatovat kov (M)

### 3.3.3. Protizánětlivé účinky flavonoidů

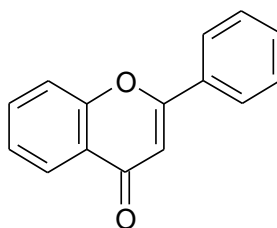
Flavonoidy mají také významnou protizánětlivou aktivitu díky inhibiční aktivitě na cyklooxygenázu respektive COX-2 protein, který je hlavní zdroj prostaglandinů účastnících se rozvoje zánětu. Protizánětlivá aktivita souvisí s dvojnou vazbou v poloze 2 a 3 a také s 4-oxoskupinou. Tuto aktivitu vykazují flavony luteolin a apigenin, avšak jejich přírodní výskyt je velmi řídký, a proto byly syntetizovány některé deriváty, které mají silnější protizánětlivou aktivitu. Vhodná se ukázala hydroxylová skupina v poloze 2',3',4' a methoxyskupina v poloze 5, 6 a 7. Methylace hydroxylových skupin v poloze 3 a 5 se ukázala jako výhodnější než přítomnost hydroxylových skupin na kruhu B. Navíc methylace 3-hydroxyskupiny redukuje cytotoxicitu (Singh et al. 2014). Inhibice COX-1 je minimální (Mladěnka et al. 2010).

### 3.3.4. Prooxidační účinky flavonoidů

Prooxidační aktivita souvisí s celkovým množstvím hydroxylových skupin. U flavonoidů s přítomností pouze mono- nebo dihydroxylových skupin nebyla prokázána prooxidační aktivita, zatímco větší počet hydroxylových skupin umístěných na kruhu B, může zvýšit produkci hydroxylových radikálů. Dále k produkci ROS v přítomnosti dvojmocné mědi může přispět i dvojná vazba v poloze 2 a 3 stejně jako 4-oxoskupina (Heim et al. 2002). Prooxidační aktivita flavonoidů je spojena s redukční aktivitou iontů přechodných kovů, které pak mohou stát za tvorbou volných radikálů (Mira et al. 2002).

## 3.4. Flavony

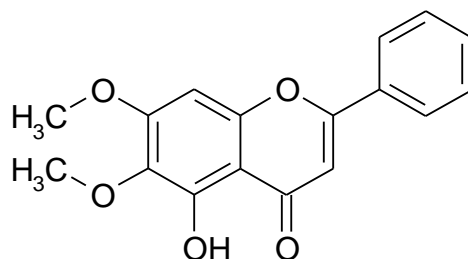
Základ jejich struktury tvoří 2-fenylchromen-4-on (Obr. 3). Vyskytují se jako aglykony nebo ve formě glykosidu.



Obrázek 3. Flavon

### 3.4.1. Mosloflavon

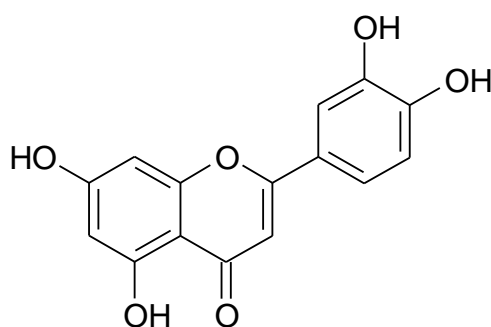
Mosloflavon (Obr. 4) je 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavon, který se nachází v rostlinách *Desmos chinensis* (Annonaceae, Righi et al. 2010) nebo *Actinocarya tibetica* (Boraginaceae). Tento flavon má významný imunomodulační a antioxidační účinek (Singh et al. 2013).



Obrázek 4. Mosloflavon

### 3.4.2. Luteolin

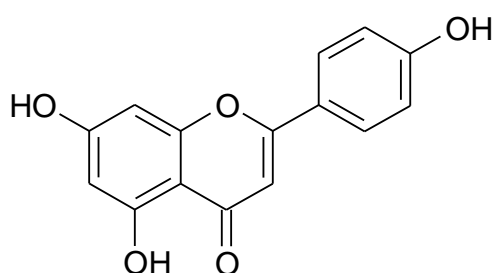
Luteolin je 3',4',5,7-tetrahydroxyflavon (Obr. 5). Dříve se používal jako žlutý pigment k barvení vlny a hedvábí. Má protikřečový, antivirový, protinádorový (Steglich 2000), protizánětlivý a antialergický účinek (Balamurugan a Karthikeyan 2012). Luteolin se nachází ve stonku a v květech *Reseda luteola* (Resedaceae), v květech náprstníku *Digitalis lutea* (Scrophulariaceae, Steglich 2000), v jazykovitých květech *Taraxacum officinale* (Hu a Kitts 2004) a *Chrysanthemum indicum* (Asteraceae, Rao 1942), dále se s ním setkáme např. u rostlin čeledi Lamiaceae *Nepeta cataria* nebo *Ajuga decumbens* (Li et al. 2010).



Obrázek 5. Luteolin

### 3.4.3. Apigenin

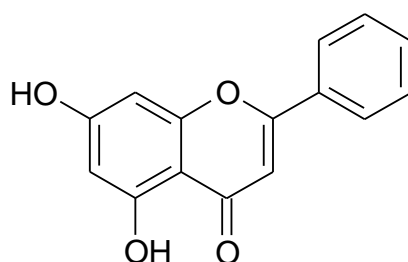
Apigenin (Obr. 6) je 4',5,7-trihydroxyflavon. Tento flavon se vyskytuje také jako aglykon, ale častěji se s ním setkáme jako glykosylovaný derivát je to např. apiin, který se nachází v semenech, listech a stonku petržele *Petroselinum crispum* (Apiaceae, Steglich 2000). Vyznačuje se antioxidační, protizánětlivou, antimutagenní, protinádorovou a spasmolytickou aktivitou. Apigenin se používá také k léčbě neústupné nespavosti, astmatu, neurologické bolesti nebo oparu (Gurung et al. 2013). Epidemiologické studie ukazují také snížení výskytu rakoviny prsu, prostaty, kůže, gastrointestinálního traktu a hematologických malignit (Shukla a Gupta 2010).



Obrázek 6. Apigenin

### 3.4.4. Chrysin

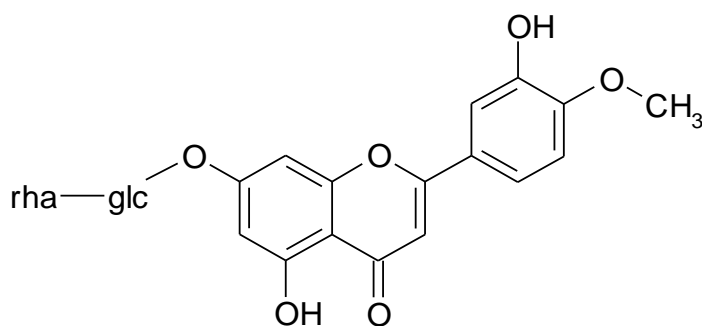
Tento flavon (Obr. 7) se používá jako komplexní činidlo s mědí. Chrysin se vyskytuje v pupenech *Populus nigra* (Salicaceae), v jádrovém dřevu různých *Pinus* species (Pinaceae) a v *Prunus avium* (Rosaceae, Steglich 2000). Chrysin se také nachází v *Passiflora incarnata* (Passifloraceae), kde byl například zkoumán potenciální anxiolytický efekt (Brown et al. 2007). Je to 5,7-dihydroxyflavon, který je studován jako potenciální inhibitor aromatázy. Tento enzym je zodpovědný za přeměnu testosteronu na estrogény (Walle et al. 2001).



Obrázek 7. Chrysin

### 3.4.5. Diosmin

Poprvé byl diosmin izolován v roce 1925 z krtičníku *Scrophularia nodosa* (Scrophulariaceae, Adouani et al. 2013). Dnes se izoluje z mnoha dalších rostlin jako *Hyssopus officinalis* (Lamiaceae) nebo rostlin rodu *Vicia* (Fabaceae). Diosmin (Obr. 8) je 3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavon-7-rhamnoglukosid (Ivashev et al. 1995). Vyznačuje se protizánětlivou a antimutagenní aktivitou. Klinické studie vykazují také zlepšení u žilních obtíží obzvláště u chronické žilní insuficience, hemoroidů, varixů nebo též při doplňkové terapii aterosklerozy (Adouani et al. 2013) a to díky vlivu na cévní stěnu a snižováním kapilární permeability. Dále je jeho potenciální využití u léčby akutní alergické rhinitidy vlivem antagonizace histaminu a inhibicí syntézy prostaglandinů (Kumar a Das 1995).

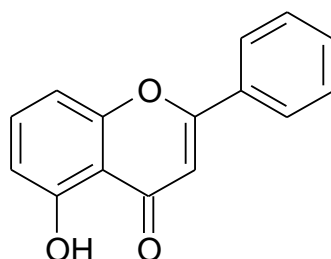


Obrázek 8. Diosmin

(rha = rhamnosa, glc = glukosa)

### 3.4.6. 5-hydroxyflavon

Primuletín neboli 5-hydroxyflavon (Obr. 9) je přirozeně se vyskytující flavon zejména v *Primula species* a *Dionysia species* (Primulaceae). Tento flavon má antioxidační, vazodilatační a antiandrogenní účinek (Uivarosi et al. 2013).

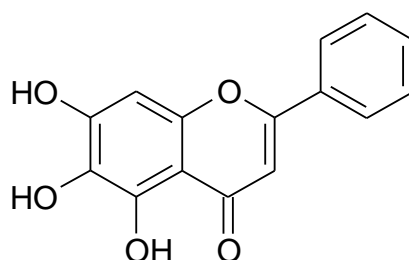


Obrázek 9. 5-hydroxyflavon



### 3.4.7. Baikalein

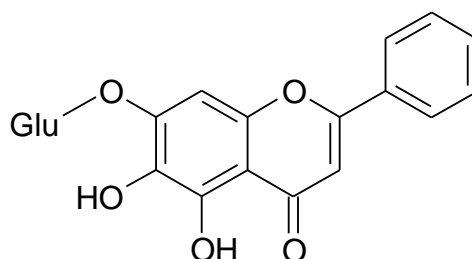
Baikalein (Obr. 10) je 5,6,7-trihydroxyflavon, který se vyskytuje v kořenu šišáku baikalského *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae), která je velmi populární v tradiční medicíně pro své antioxidační a cytostatické působení (Lombardo et al. 2013). Baikalein může být použit i v kosmetice jako depigmentační činidlo díky působení inhibice tyrosinázy (Singh et al. 2014).



Obrázek 10. Baikalein

### 3.4.8. Baikalin

Stejně jako baikalein se tento flavon vyskytuje v rostlině *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae, Perez et al. 2009) nebo ho můžeme také nalézt v kořeni *Sophora flavescens* (Fabaceae, Zhang et al. 2007). Baikalin je O-glykosylovaný derivát baikaleinu, kde je v poloze 7 navázaná molekula glukuronové kyseliny (Obr. 11). V poslední době mnoho studií ukázalo jeho pozitivní působení. Má protizánětlivý, protinádorový a antioxidační účinek. Již po staletí se používá v tradiční medicíně k léčbě horečky, nespavosti (Perez et al. 2009), hepatitidě, zvracení nebo kašli (Chen et al. 2000).

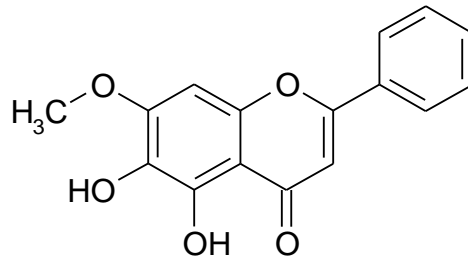


Obrázek 11. Baikalin

(glu = glukuronová kyselina)

### 3.4.9. Negletein

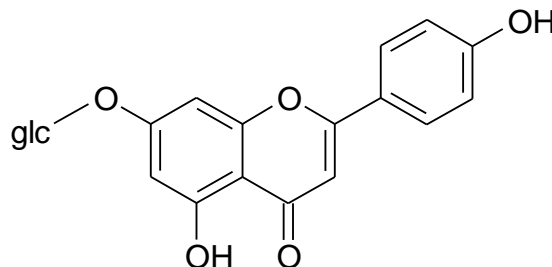
Negletein je 5,6-dihydroxy-7-methoxyflavon (Obr. 12). Vyskytuje se v *Desmos chinensis* (Annonaceae). Tato rostlina se využívá jako prostředek v lidovém léčitelství, má antimalarický, insekticidní, antirevmatický, spasmolytický a analgetický účinek (Kiem et al. 2005). Negletein je známý chelátor železa, který může přispět k inhibici tvorby ROS (Banerjee et al. 2014).



Obrázek 12. Negletein

### 3.4.10. Apigenin-7-glukosid

Apigenin-7-glukosid (Obr. 13) je přirozeně se vyskytující glukosid (Gurung et al. 2013). Vyznačuje se antioxidační, protizánětlivou, protinádorovou aktivitou nebo působí jako prevence koronárních nemocí. Nachází se v *Humulus scandens* (Cannabaceae, Chen et al. 2011) nebo ho můžeme najít i v květech *Chamomile ligulate* (Asteraceae). Tento flavon se enzymatickou transformací přeměňuje na aglykon apigenin, čehož se využívá kvůli výrazné spasmolytické aktivitě apigeninu, která je až 3,29 krát větší než u papaverinu (Pekić et al. 1994).



Obrázek 13. Apigenin-7-glukosid

(glc = glukosa)

## **4. Experimentální část**

### **4.1. Materiál**

- Mikrotitrační destičky (Brand)
- Automatické pipety různých objemů (Brand)
- Vícekanálové pipety různých objemů (Biohit)

### **4.2. Přístrojové vybavení**

- Analytické váhy KERN ABT120-5DM
- Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA<sup>®</sup> MS 3 digital
- Třepačka pro zkumavky IKA<sup>®</sup> VORTEX GENIUS 3
- Ultrazvuková lázeň KRAINTEK<sup>®</sup>
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky SYNERGY HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

### **4.3. Chemikálie**

- Disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS) (Sigma-Aldrich)
- Hydroxylamin hydrochlorid (HA) (Sigma-Aldrich)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Lach-Ner)
- Pentahydrát síranu měďnatého (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) (Sigma-Aldrich)
- Pufř pH 7.5, 6.8, 5.5, 4.5

#### ***4.4. Testované látky***

- Mosloflavon
- Luteolin
- Apigenin
- Chrysin
- Diosmin
- 5-hydroxyflavon
- Negletein
- Baikalein
- Baikalin
- Apigenin-7-glukosid

Apigenin-7-glukosid byl zakoupen od firmy Extrasynthese (Francie), mosloflavon a negletein byly syntetizovány z chrysinu dle Righi et al. (2010) postupem popsáním v článku Convergent synthesis of mosloflavone, negletein and baicalein from chrysin. Ostatní flavony byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Německo).

#### ***4.5. Příprava zásobních a pracovních roztoků***

- ***Roztok měďnatých iontů 5mM***

Roztok 5mM měďnatých iontů byl připraven rozpuštěním pentahydrátu síranu měďnatého  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  v destilované vodě na požadovanou koncentraci ( $M_w = 249,69$  g/mol). Připravený zásobní roztok byl stabilní při uchovávání v lednici. Poté probíhalo další ředění 5mM zásobního roztoku měďnatých iontů v dimethylsulfoxidu na požadovanou koncentraci pracovního roztoku dle konkrétních požadavků.

- ***Roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny 5mM***

Zásobní roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS) byl připraven jejím rozpuštěním v destilované vodě ( $M_w = 564,54$  g/mol) na požadovanou 5mM koncentraci.

- ***Roztok hydroxylamin hydrochloridu 10mM***

Roztok hydroxylamin hydrochloridu (HA) byl připraven jeho rozpuštěním v destilované vodě ( $M_w = 69,49$  g/mol) na požadovanou koncentraci 100mM. Následně byl zásobní roztok naředěn v destilované vodě na 10mM koncentraci.

- ***Roztok hydroxylamin hydrochloridu 1mM***

Roztok hydroxylamin hydrochloridu (HA) byl připraven jeho rozpuštěním v destilované vodě ( $M_w = 69,49$  g/mol) na požadovanou koncentraci 100mM. Následně byl zásobní roztok naředěn v destilované vodě na 1mM koncentraci.

- ***Roztok testované látky***

Základní roztoky testovaných flavonů byly připraveny rozpuštěním v dimethylsulfoxidu (DMSO) na obvykle 10mM koncentraci. Další ředění testovaných látek v dimethylsulfoxidu na požadovanou koncentraci pracovního roztoku probíhalo dle konkrétní potřeby v jednotlivých měřeních.

#### 4.6. Kalibrace měďnatých iontů

Pro sestavení kalibrační křivky měďnatých iontů závislosti absorbance na koncentraci byly použity roztoky  $\text{Cu}^{2+}$  iontů o stanovených koncentracích. Byla změřena absorbance spektrofotometrickou analýzou a těmito naměřenými výsledky byla poté zkonstruována přímka a byl vytvořen graf.

- Byly připraveny požadované základní a pracovní roztoky:  
1mM roztok hydroxylamin hydrochloridu  
roztoky měďnatých iontů o koncentraci 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  a 250  $\mu\text{M}$   
5mM roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny (BCS)
- Poté pipetováno 150  $\mu\text{l}$  pufru o pH 6.8 do jamek mikrotitrační destičky (Obr. 15)
- Dále bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  1mM roztoku hydroxylamin hydrochloridu
- Přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku předem připravených měďnatých iontů požadované koncentrace do testovacích jamek (Obr. 14, znázorněno zeleně) nebo přidáno 50  $\mu\text{l}$  destilované vody do kontrolních jamek (Obr. 14, znázorněno modře)
- Byla míchána mikrotitrační destička na třepačce IKA<sup>®</sup> po dobu 1 minuty
- Přidáno 50  $\mu\text{l}$  předem připraveného roztoku BCS do horní poloviny jamek na mikrotitrační destičce (Obr. 14, znázorněno červeně), do druhé spodní poloviny přidáno 50  $\mu\text{l}$  destilované vody (Obr. 14, znázorněno červeně)
- Byla ihned změřena absorbance při vlnové délce  $\lambda$  484 nm za použití spektrofotometru
- Poté byla změřena absorbance při vlnové délce  $\lambda$  484 nm v čase 5 minut tzn. měřeno v čase 4 min 30 s
- Byly zaznamenány naměřené hodnoty absorbance A při vlnové délce  $\lambda$  484 nm a překopírovány do tabulky v MS Excelu
- Sestrojen graf kalibrační křivky z naměřených hodnot absorbance

	Kontrola – přidaná $c(\text{Cu}^{2+}) = 0 \mu\text{M}$	Přidaná $c(\text{Cu}^{2+}) = 50 \mu\text{M}$	Přidaná $c(\text{Cu}^{2+}) = 100 \mu\text{M}$	Přidaná $c(\text{Cu}^{2+}) = 150 \mu\text{M}$	Přidaná $c(\text{Cu}^{2+}) = 200 \mu\text{M}$	Přidaná $c(\text{Cu}^{2+}) = 250 \mu\text{M}$
Jamky s indikátorem						
Slepé vzorky						



Jamky s roztokem disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny



Slepé vzorky – obsahují destilovanou vodu

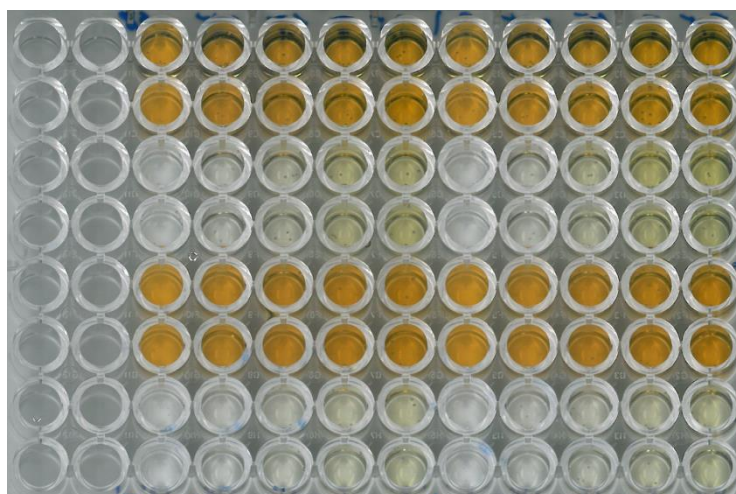


Kontrolní jamky – bez přítomnosti  $\text{Cu}^{2+}$  iontů



Testované jamky – použita příslušná koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  iontů

Obrázek 14. Schéma mikrotitrační destičky při kalibraci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů



Obrázek 15. Mikrotitrační destička

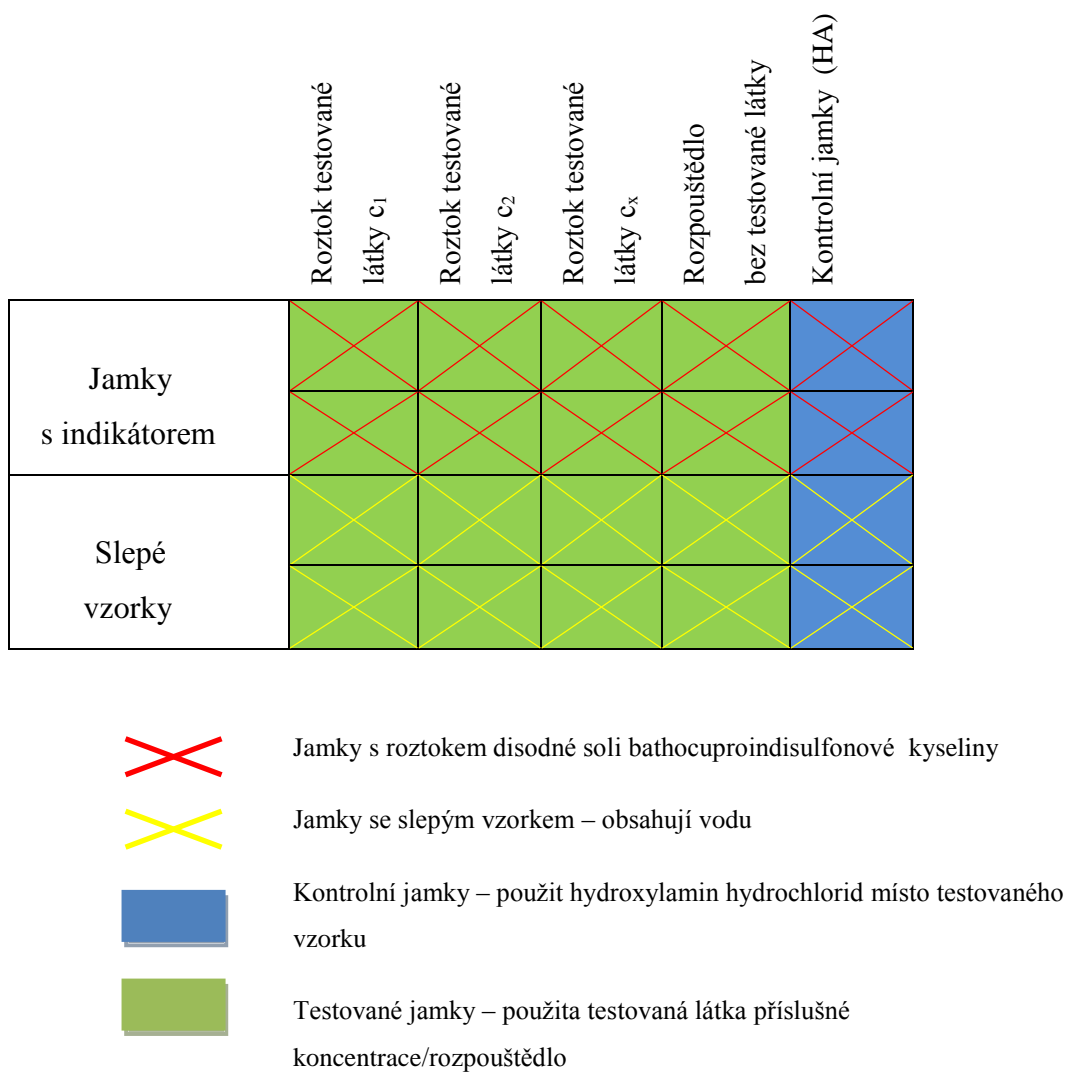
#### 4.7. Metodický postup stanovení redukce měďnatých iontů v pufru

Při redukci měďnatých iontů byl mísen roztok testované látky s roztokem měďnatých iontů a se stanovovaným pufrem. Poté se přidal roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny nebo v případě, že se jednalo o kontrolní vzorek, byla přidána voda (tzv. blank). Poté byla měřena absorbance spektrofotometrickou analýzou.

- Byly připraveny požadované základní a pracovní roztoky:  
roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny o koncentraci 5 mM  
roztok  $\text{Cu}^{2+}$  iontů zředěn v čas potřeby v DMSO na koncentraci 250  $\mu\text{M}$   
testované látky flavonů ředěny v dimethylsulfoxidu na požadovanou koncentraci u konkrétních úloh
- Poté bylo pipetováno 100  $\mu\text{l}$  pufru o příslušném pH (7.5, 6.8, 5.5, 4.5) do jamek mikrotitrační destičky
- Přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku konkrétní testované látky (flavonu) příslušné koncentrace do testovacích jamek, popřípadě rozpouštědla tj. dimethylsulfoxidu pro negativní kontrolu (zde je koncentrace flavonu nulová) nebo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku 1mM hydroxylamin hydrochloridu (pro pH 7.5 a 6.8), pro ostatní pH (pH 5.5 a 4.5) bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku 10mM hydroxylamin hydrochloridu do kontrolních jamek (Obr. 16, znázorněno modře) jako pozitivní kontrola představující 100% redukci měďnatých iontů
- Dále bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  250 $\mu\text{M}$  roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů do všech jamek mikrotitrační destičky
- Byla míchána mikrotitrační destička na třepačce po dobu 2 minut
- Dále přidáno 50  $\mu\text{l}$  5mM roztoku disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny (indikátor) do horní poloviny jamek na mikrotitrační destičce (Obr. 16, znázorněno červeně), do druhé spodní poloviny přidáno 50  $\mu\text{l}$  vody (Obr. 16, znázorněno žlutě)
- Ihned byla změřena absorbance na příslušném spektrofotometru při vlnové délce  $\lambda$  484 nm pro všechny stanovované pH (7.5, 6.8, 5.5, 4.5)



- Poté změřena absorbance po 5 minutách při stejné vlnové délce tzn. bylo měřeno v čase 4 min 30 s
- Zaznamenány naměřené hodnoty absorbance A do tabulky
- Využita statistická analýza na propoččet stanovených hodnot
- Sestrojen graf křivky



Obrázek 16. Schéma mikrotitrační destičky při stanovení redukce  $\text{Cu}^{2+}$  iontů

Konečný obsah jamky v mikrotitrační destičce při redukci  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v pufru tvoří:

100  $\mu\text{l}$  příslušného pufru

50  $\mu\text{l}$  roztoku testované látky/ rozpouštědla nebo roztoku HA

50  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  iontů

50  $\mu\text{l}$  roztoku BCS nebo destilované vody

#### **4.8. *Statistická analýza***

K provedení statistické analýzy byl použit program MS Excel 2010 a GraphPad Prism verze 6 pro Windows (GraphPad Software, USA). Při porovnávání mezi maximy u jednotlivých látek byl použit test rozptylu ANOVA s Bonferroniho post testem. Výsledky byly zpracovány a prezentovány jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka

vypočítaná podle vzorce  $\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}}$ .

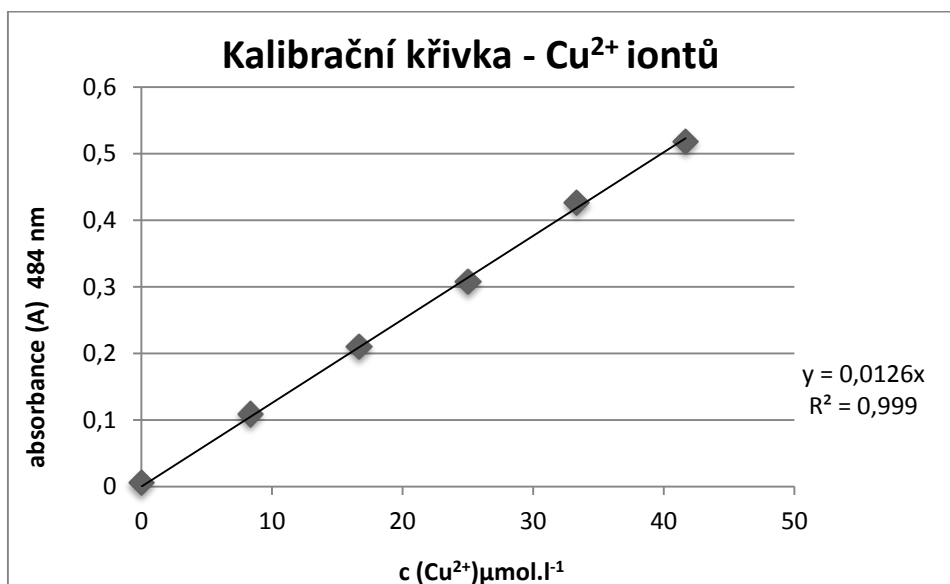
## 5. Výsledky

### 5.1. Kalibrační křivka

Z naměřených hodnot absorbancí získaných dle postupu znázorněného na Obr. 14, byl sestrojen graf kalibrační křivky (Obr. 17). Byly použity koncentrace 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  měďnatých iontů (Tab. 1). Závislost absorbance na koncentraci měďnatých iontů zapracovaná do grafu je lineární.

Základní c / $\mu\text{M}$ /	0	50	100	150	200	250
Finální c / $\mu\text{M}$ /	0	8,333333	16,66667	25	33,33333	41,66667
Průměr A	0,006333	0,109333	0,21	0,308333	0,426667	0,518667

Tabulka 1. Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky



Obrázek 17. Kalibrační křivka  $\text{Cu}^{2+}$  iontů

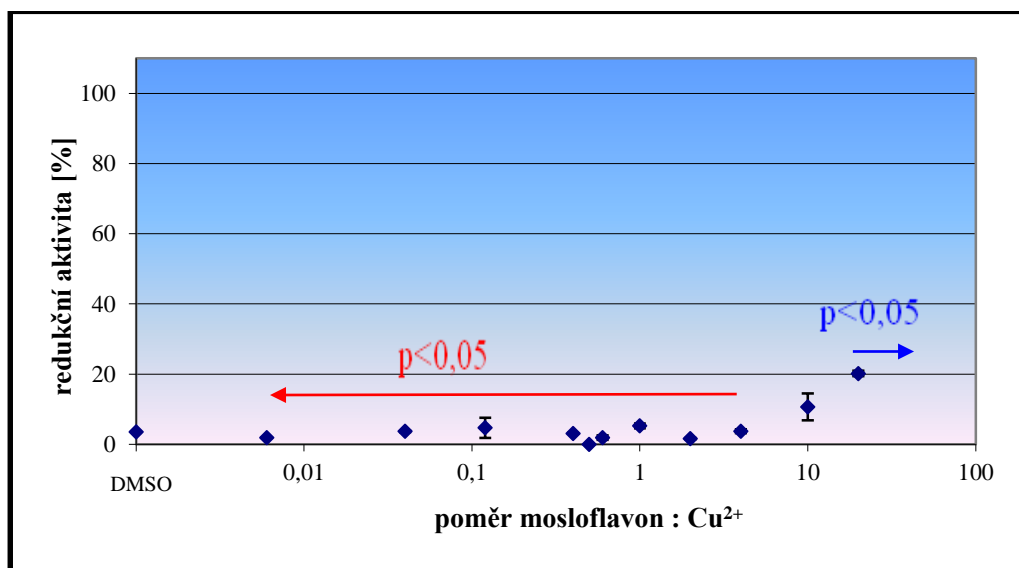
## 5.2. Redukční aktivita testovaných flavonů

Redukční aktivita flavonů byla testována *in vitro* v různých koncentračních poměrech jednotlivých hodnocených látek vůči měďnatým iontům a v prostředí o různém pH. Redukční aktivita měřených flavonů: mosloflavon (Obr. 18-21), luteolin (Obr. 22-25), apigenin (Obr. 28-31), chrysin (Obr. 32-35), diosmin (Obr. 36-39), 5-hydroxyflavon (Obr. 42-45), negletein (Obr. 46-49), baikalein (Obr. 52-55), baikalin (Obr. 58-61), apigenin-7-glukosid (Obr. 64-67) byla stanovena na základě naměřených hodnot absorbance a převedena do grafů. Grafy znázorňují schopnost hodnocených flavonů redukovat měďnaté ionty na měďné při pH 4.5, 5.5, 6.8 a 7.5, kde červené šipky znázorňují statisticky odlišné hodnoty v porovnání s redukčním maximem a modrá šipka či modrá úsečka znázorňuje statisticky odlišné hodnoty v porovnání s rozpouštědlem DMSO. Redukční aktivita je shrnuta i v rámci jednotlivých testovaných pH (Obr. 68, 70, 72, 74). V rámci jednotlivých pH jsou taktéž shrnuty koncentrační poměry hodnocených flavonů, které v daném pH vykazovaly redukční schopnosti (Obr. 69, 71, 73, 75).

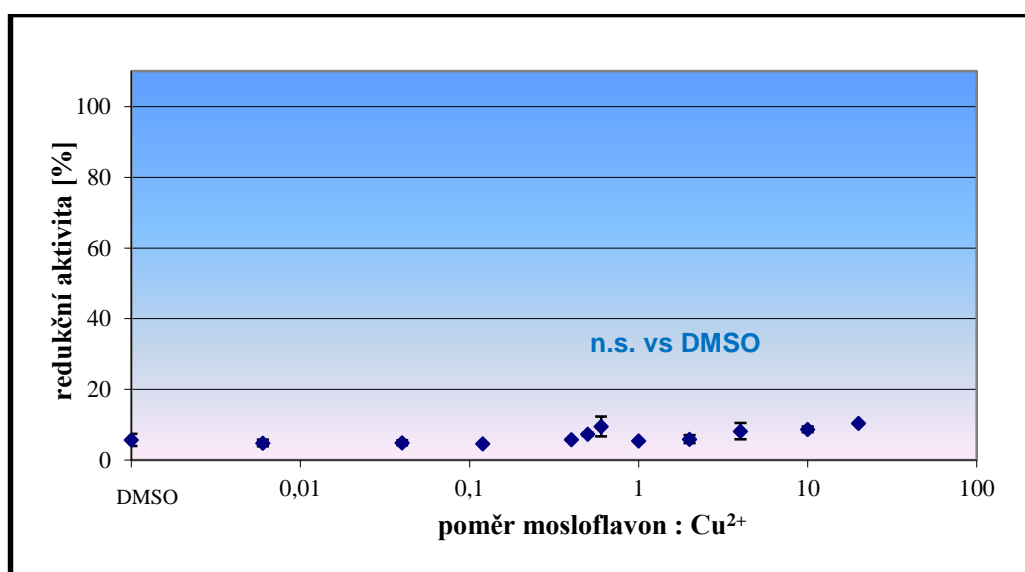
Dále jsou zde také uvedeny grafy dosažených redukčních maxim flavonů v jednotlivých testovaných pH a grafy znázorňující koncentrační poměr flavonu a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity v jednotlivých testovaných pH. Na těchto grafech červený křížek zobrazuje maximum redukce, černé přímky znázorňují poměry, které nejsou ze statistického hlediska rozdílné od maxima redukce. Tyto grafy jsou uvedeny pouze u těch hodnocených flavonů, které vykazují redukci ve všech testovaných pH (Obr. 26, 27, 40, 41, 50, 51, 56, 57, 62, 63).

Statistická analýza redukčních potenciálů v jednotlivých pH hodnotách, která byla zpracována pomocí GraphPad Prism, je vyobrazena v tabulkách 2-5.

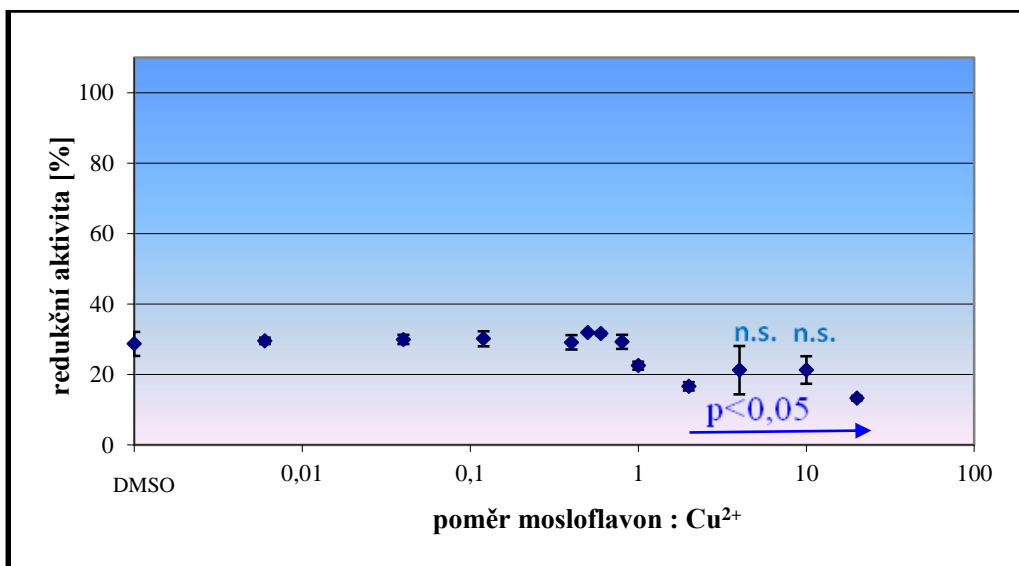
### 5.2.1. Redukční aktivita mosloflavonu



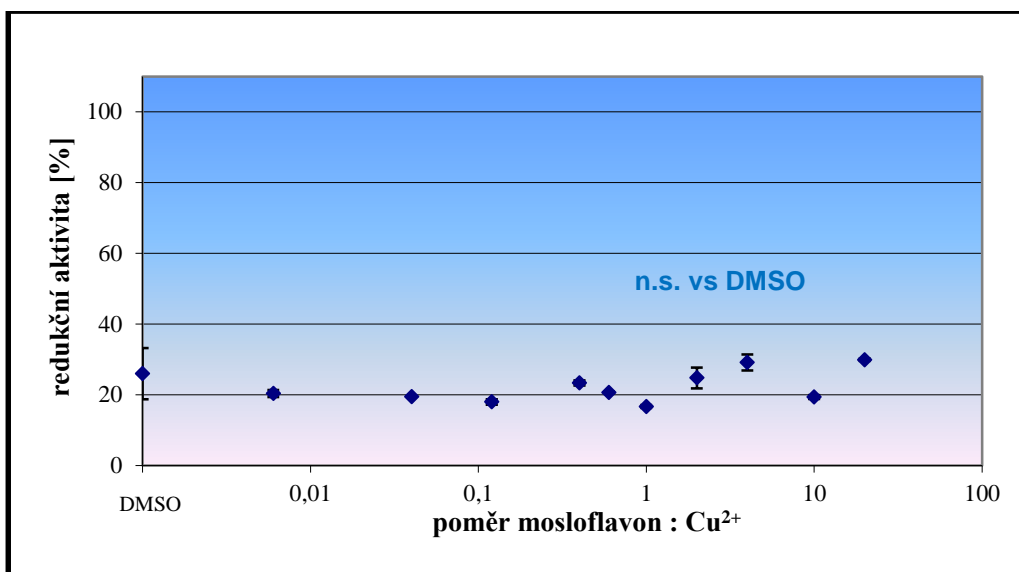
Obrázek 18. Redukční aktivita mosloflavonu při pH 4.5 v čase 5 min



Obrázek 19. Redukční aktivita mosloflavonu při pH 5.5 v čase 5 min

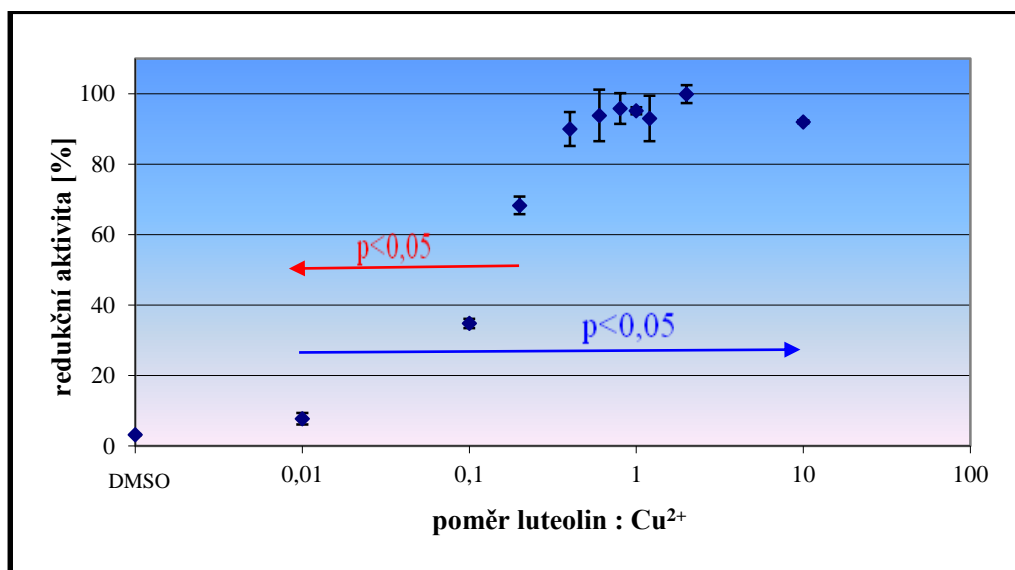


Obrázek 20. Redukční aktivita mosloflavonu při pH 6.8 v čase 5 min

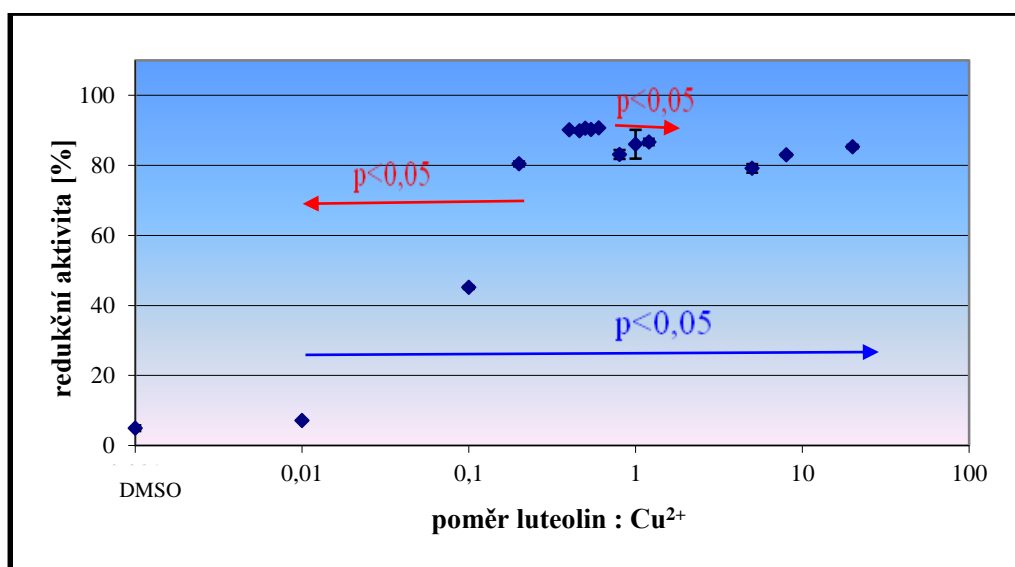


Obrázek 21. Redukční aktivita mosloflavonu při pH 7.5 v čase 5 min

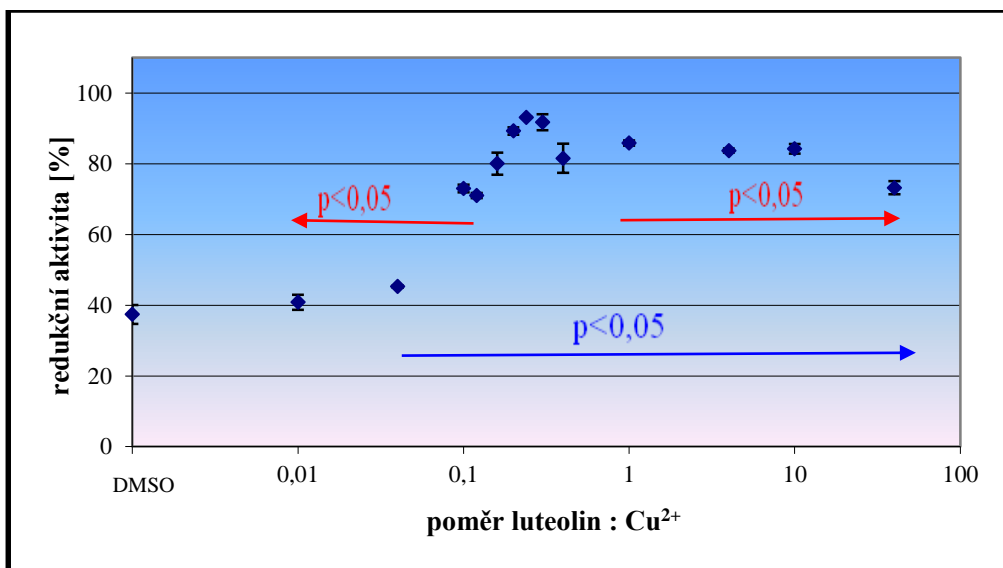
### 5.2.2. Redukční aktivita luteolinu



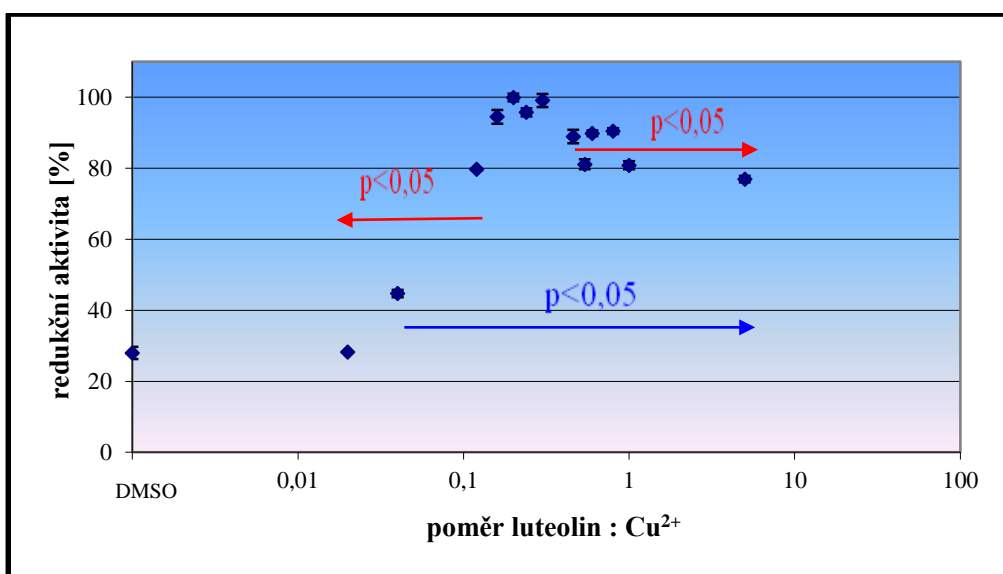
Obrázek 22. Redukční aktivita luteolinu při pH 4.5 v čase 5 min



Obrázek 23. Redukční aktivita luteolinu při pH 5.5 v čase 5 min

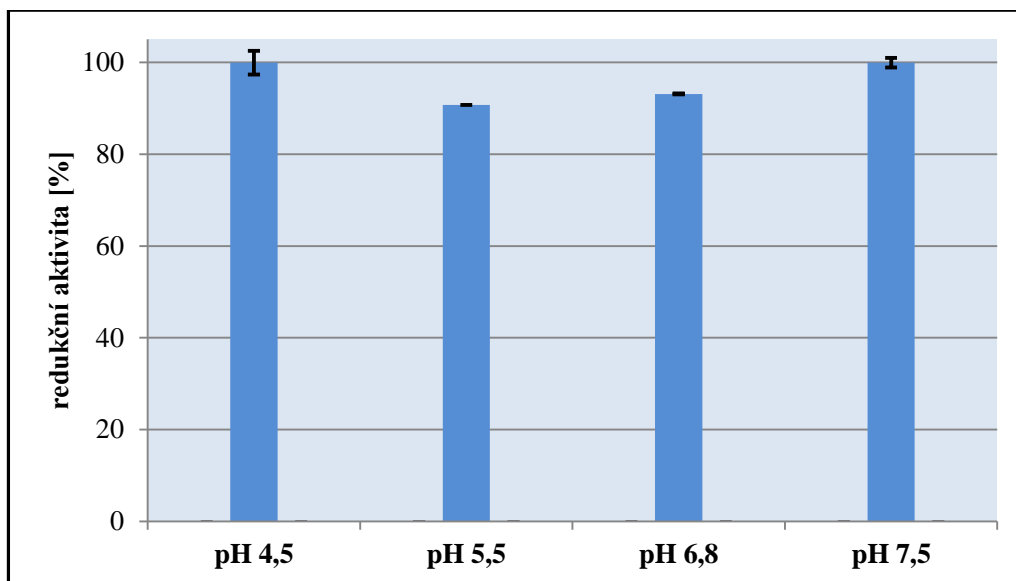


Obrázek 24. Redukční aktivita luteolinu při pH 6.8 v čase 5 min

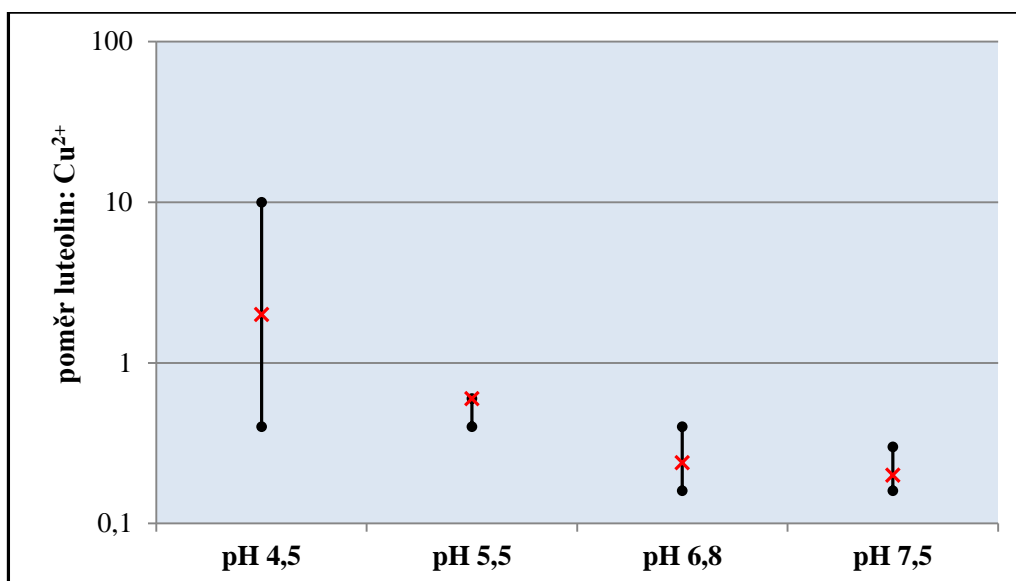


Obrázek 25. Redukční aktivita luteolinu při pH 7.5 v čase 5 min



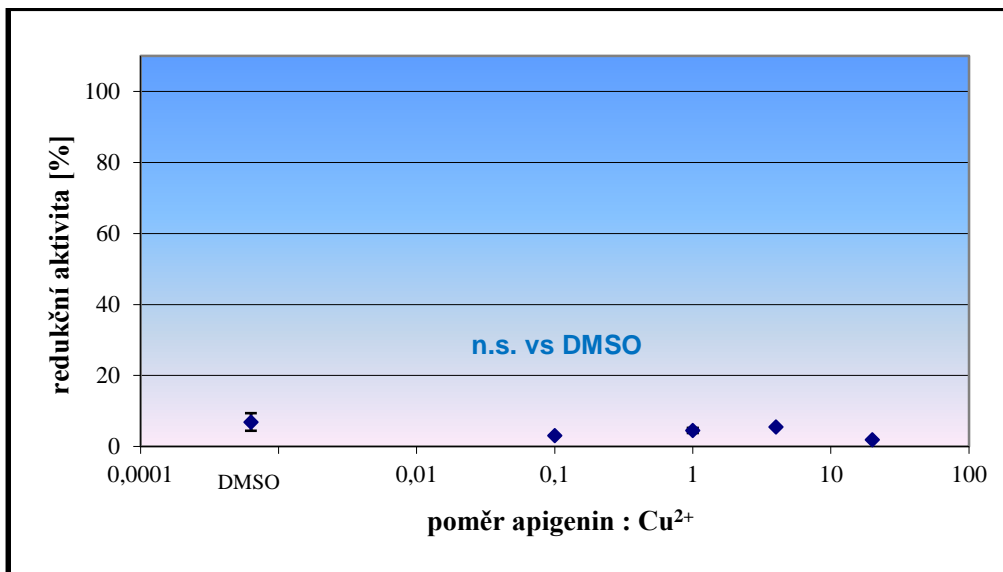


Obrázek 26. Dosažená redukční maxima luteolinu v jednotlivých testovaných pH

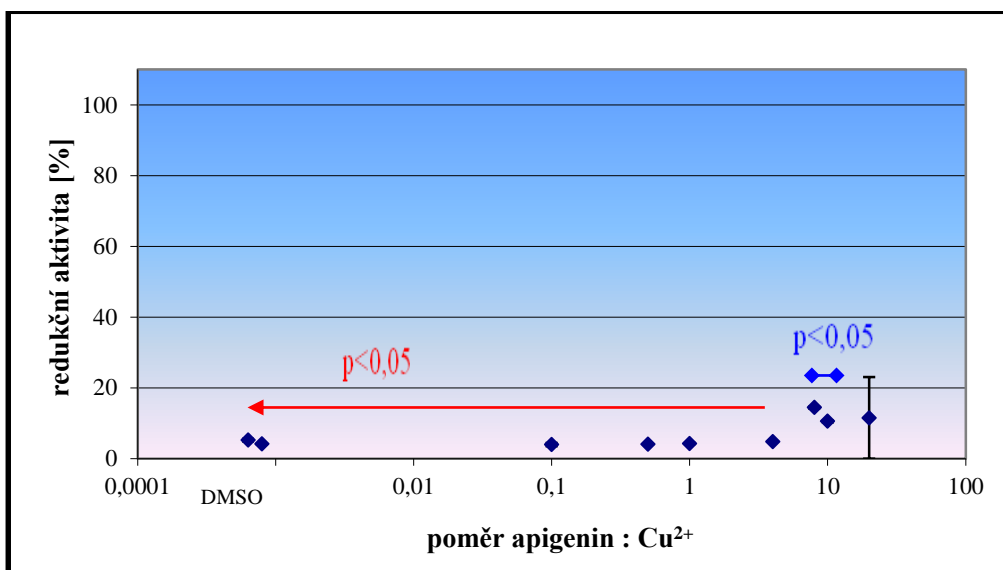


Obrázek 27. Koncentrační poměr luteolinu a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity v jednotlivých testovaných pH

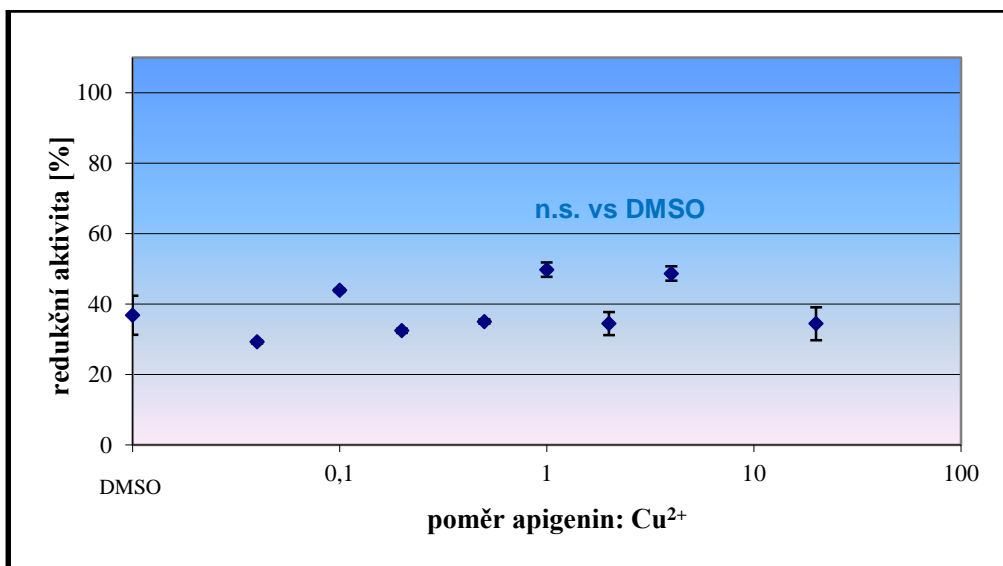
### 5.2.3. Redukční aktivita apigeninu



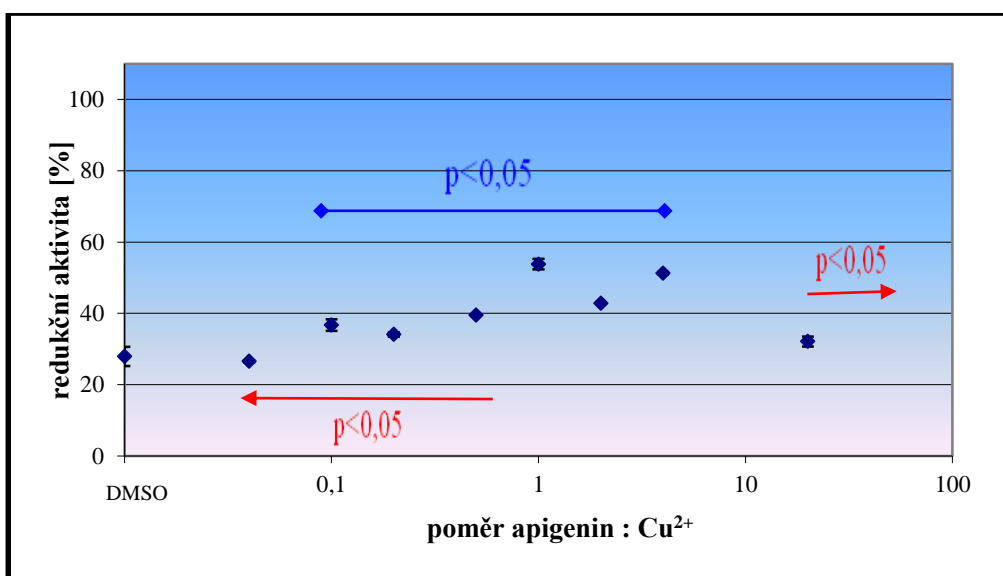
Obrázek 28. Redukční aktivita apigeninu při pH 4.5 v čase 5 min



Obrázek 29. Redukční aktivita apigeninu při pH 5.5 v čase 5 min

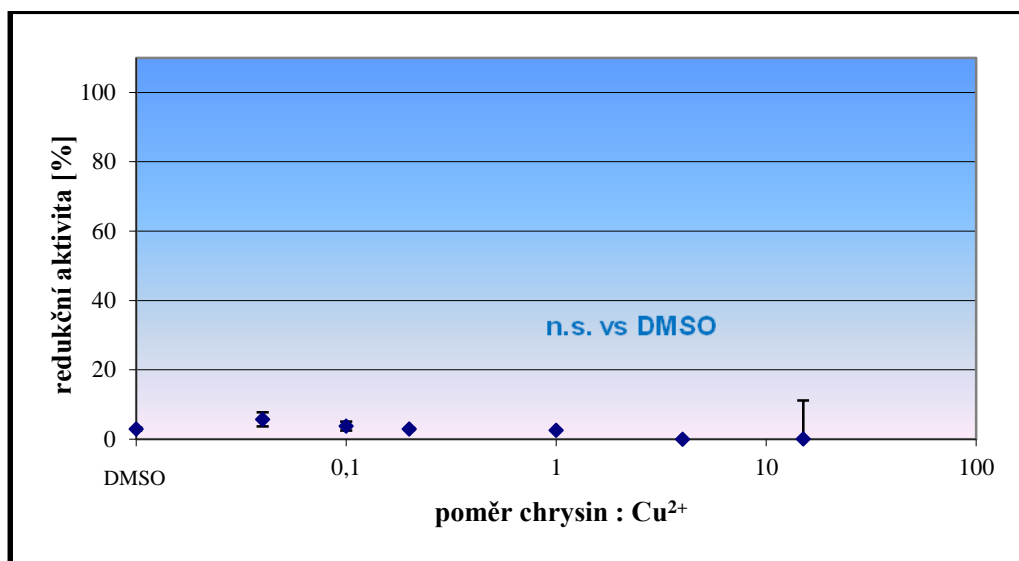


Obrázek 30. Redukční aktivita apigeninu při pH 6.8 v čase 5 min

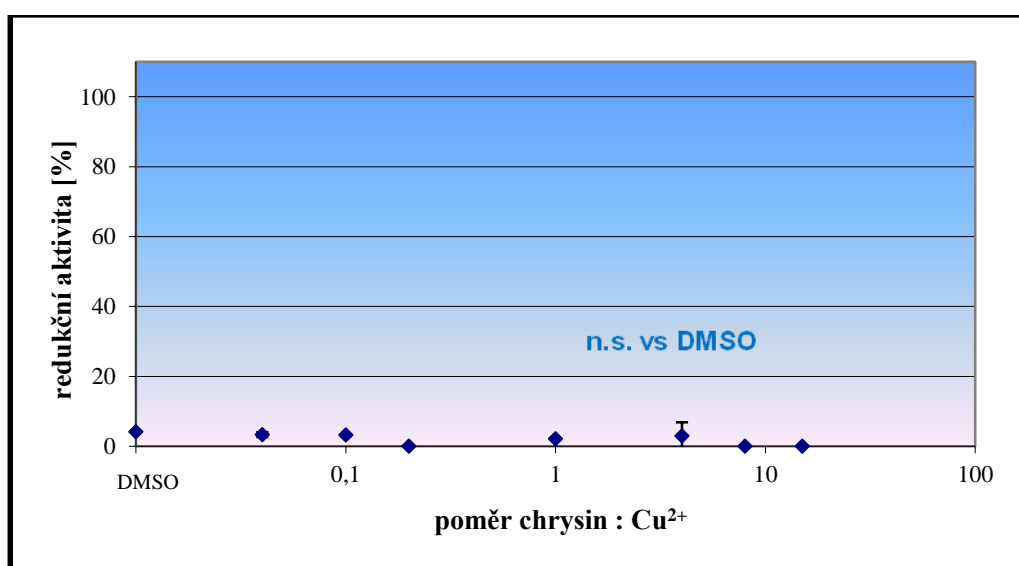


Obrázek 31. Redukční aktivita apigeninu při pH 7.5 v čase 5 min

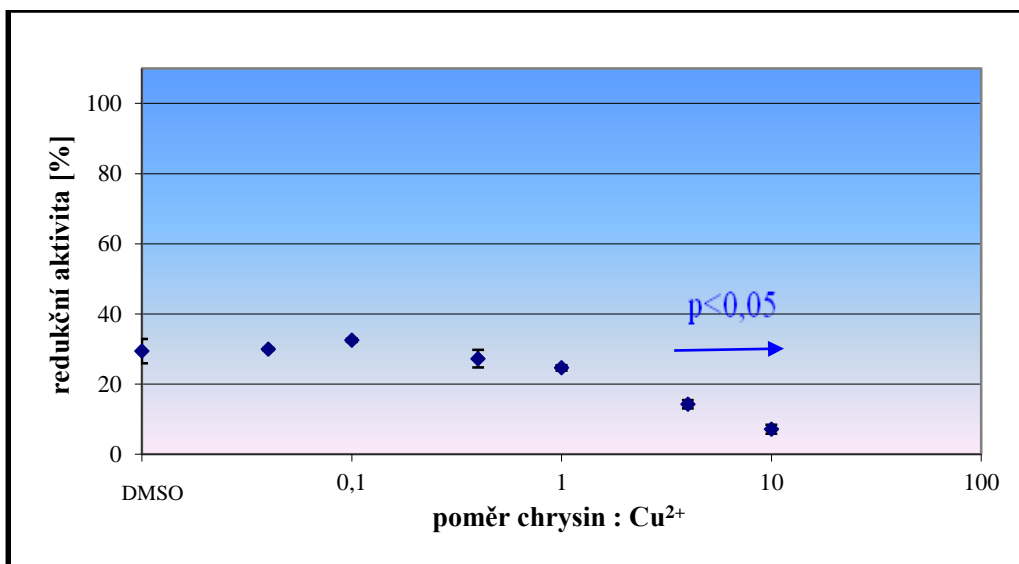
#### 5.2.4. Redukční aktivita chrysinu



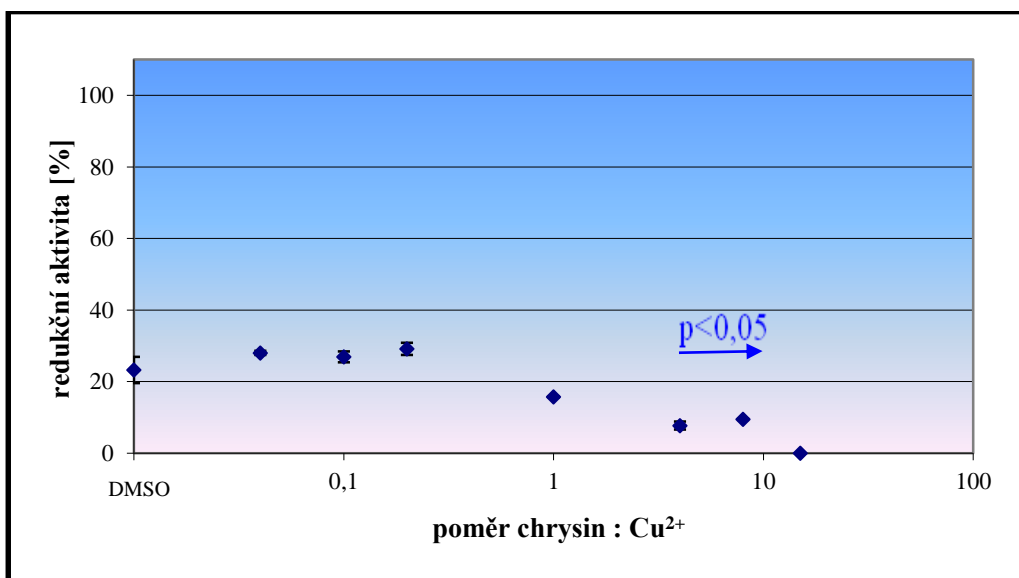
Obrázek 32. Redukční aktivita chrysinu při pH 4.5 v čase 5 min



Obrázek 33. Redukční aktivita chrysinu při pH 5.5 v čase 5 min

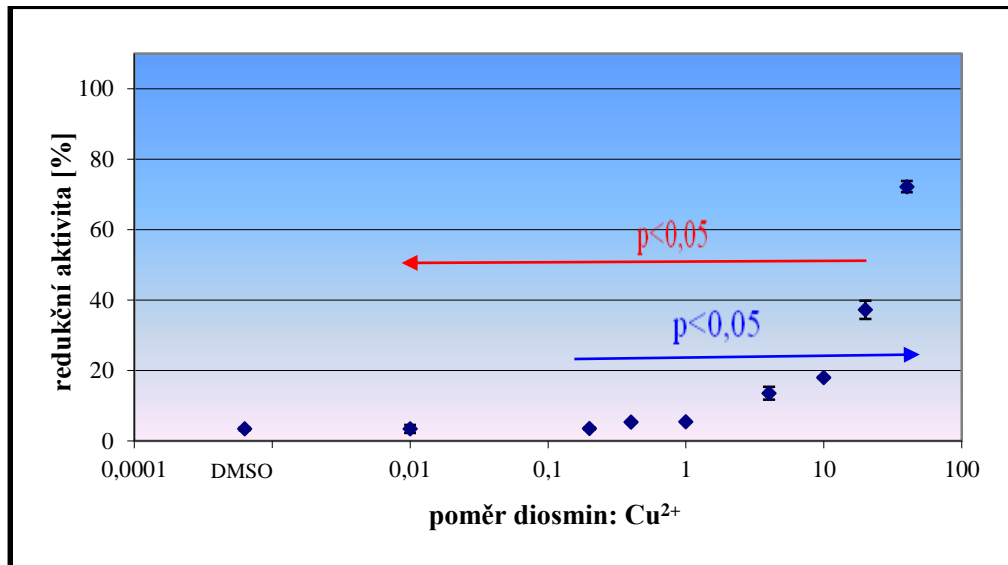


Obrázek 34. Redukční aktivita chrysinu při pH 6.8 v čase 5 min

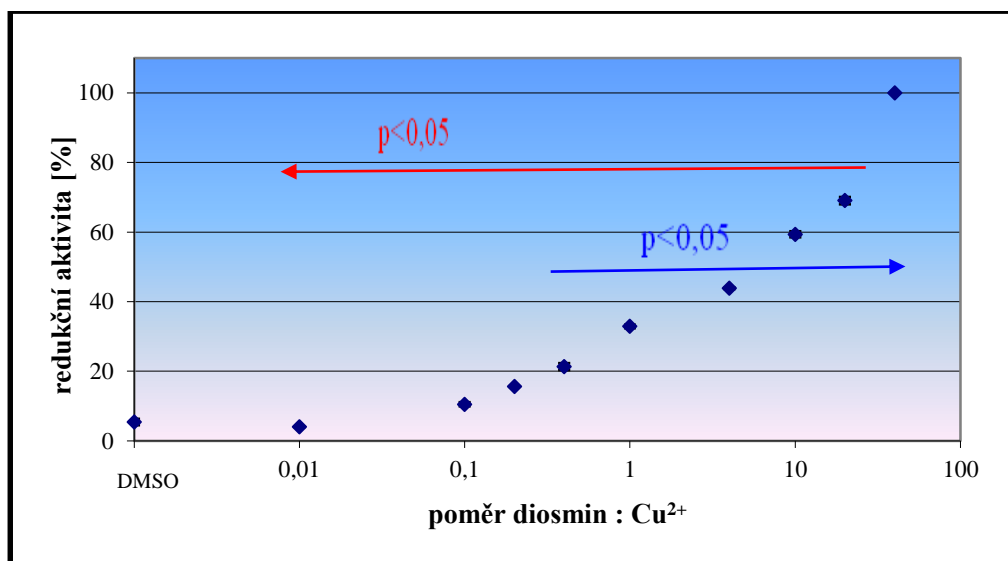


Obrázek 35. Redukční aktivita chrysinu při pH 7.5 v čase 5 min

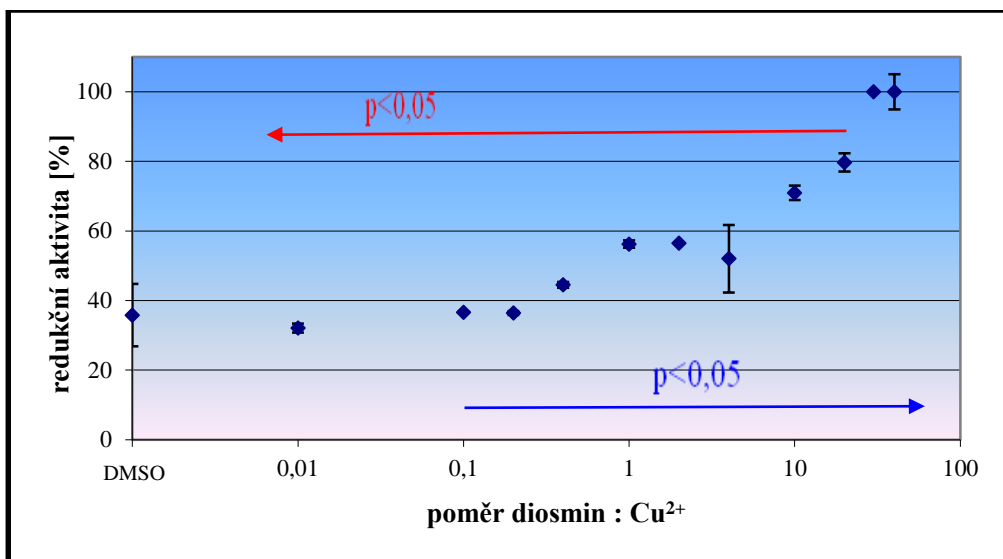
### 5.2.5. Redukční aktivita diosminu



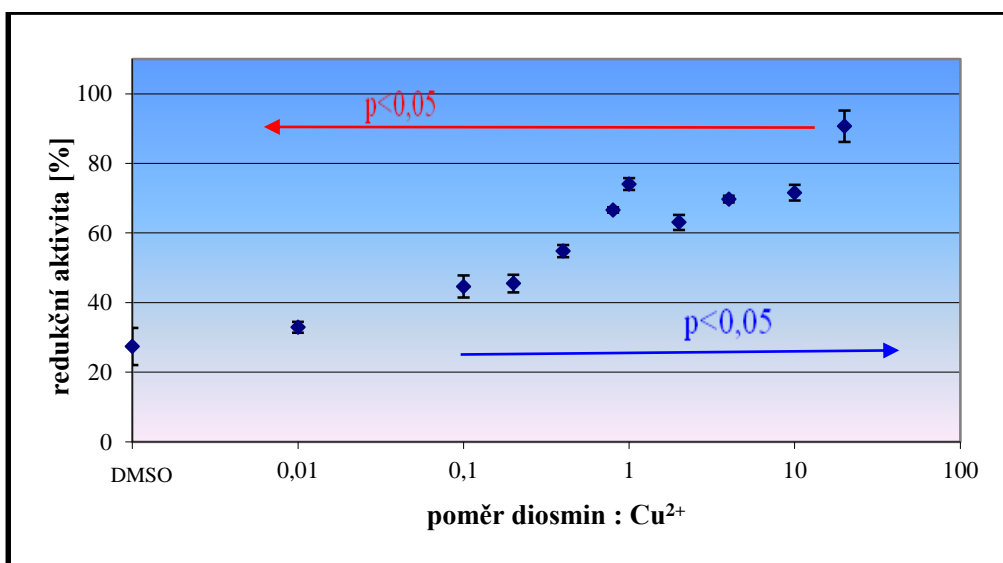
Obrázek 36. Redukční aktivita diosminu při pH 4.5 v čase 5 min



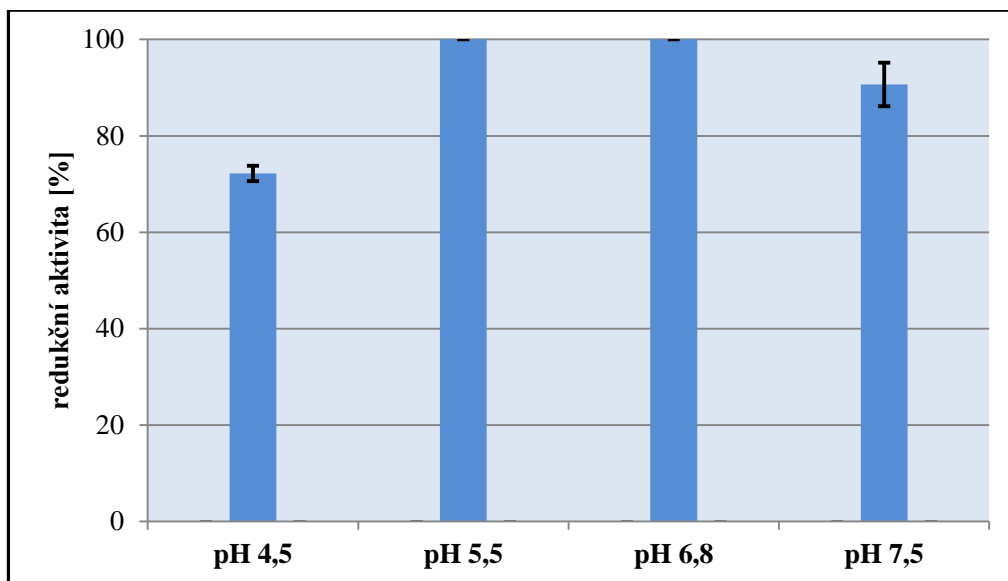
Obrázek 37. Redukční aktivita diosminu při pH 5.5 v čase 5 min



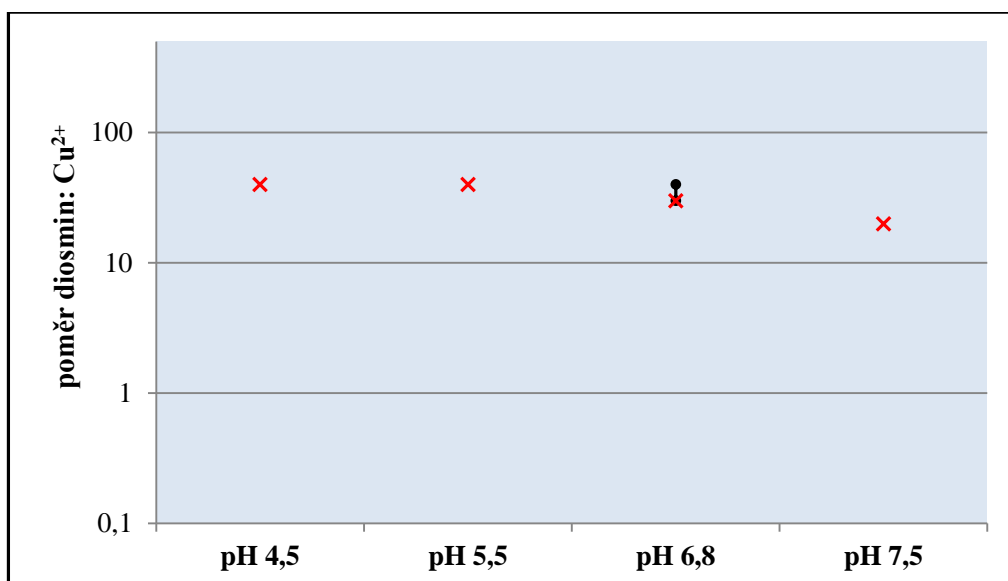
Obrázek 38. Redukční aktivita diosminu při pH 6.8 v čase 5 min



Obrázek 39. Redukční aktivita diosminu při pH 7.5 v čase 5 min



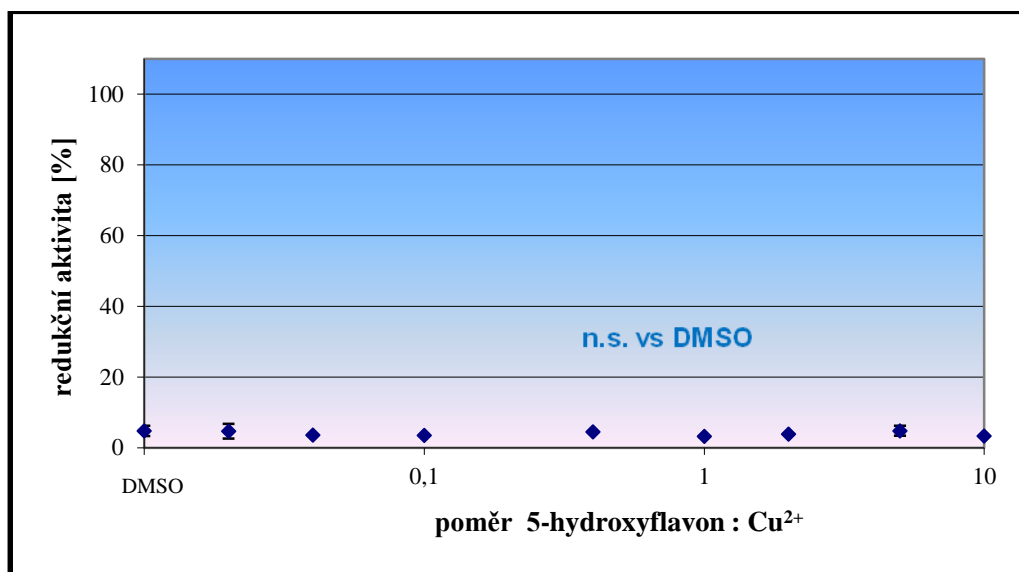
Obrázek 40. Dosažená redukční maxima diosminu v jednotlivých testovaných pH



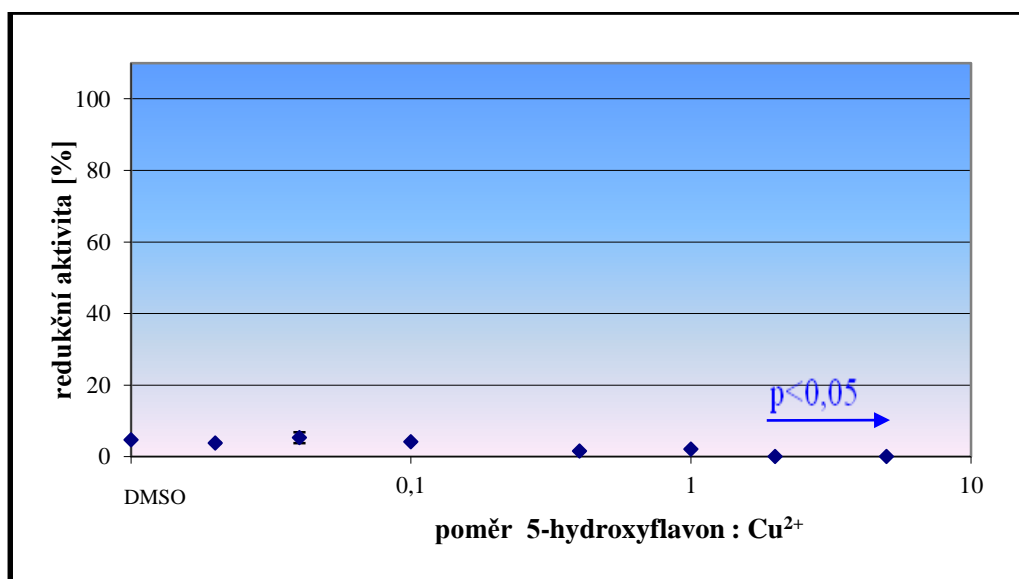
Obrázek 41. Koncentrační poměr diosminu a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity v jednotlivých testovaných pH



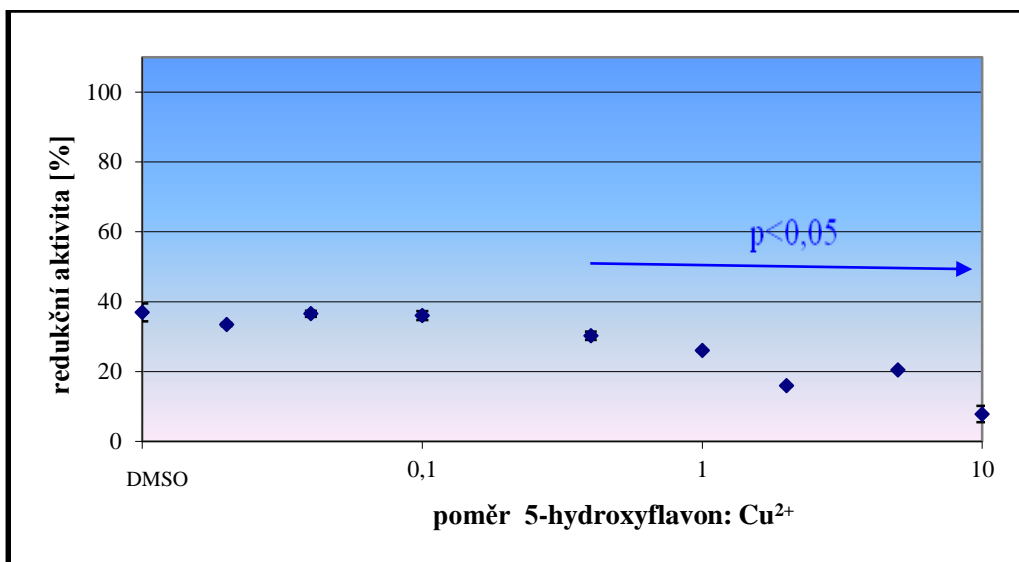
### 5.2.6. Redukční aktivita 5-hydroxyflavonu



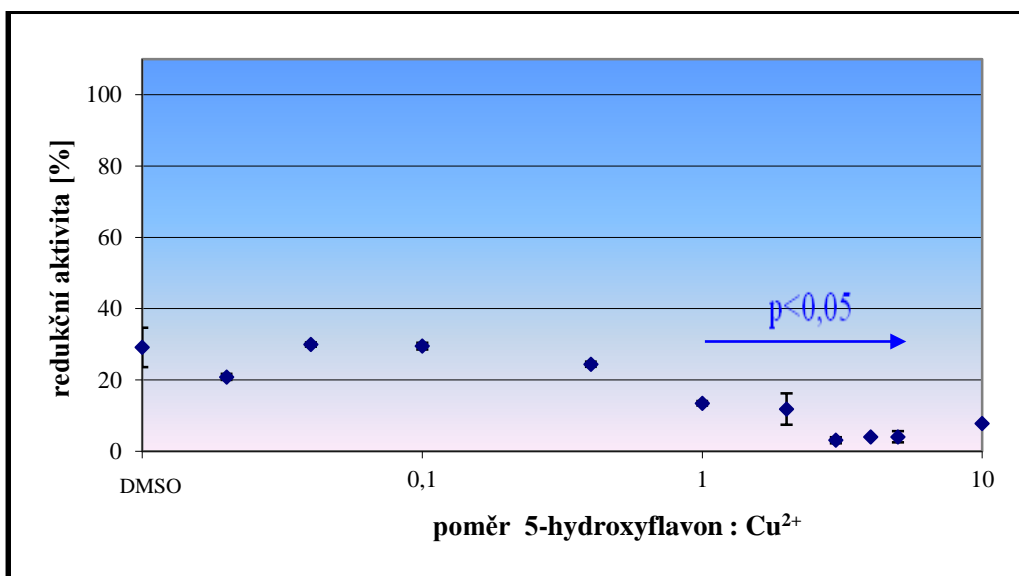
Obrázek 42. Redukční aktivita 5-hydroxyflavonu při pH 4.5 v čase 5 min



Obrázek 43. Redukční aktivita 5-hydroxyflavonu při pH 5.5 v čase 5 min

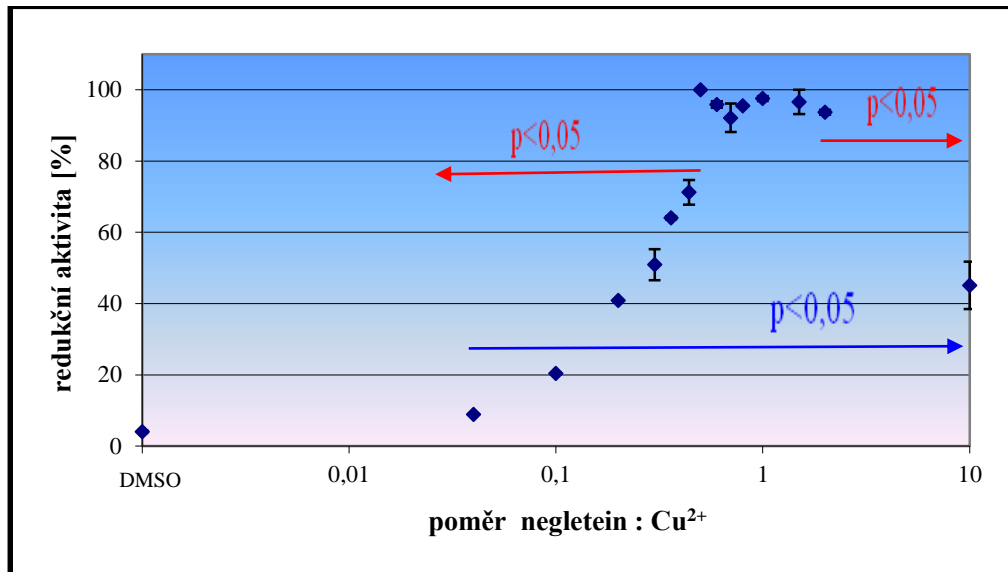


Obrázek 44. Redukční aktivita 5-hydroxyflavonu při pH 6.8 v čase 5 min

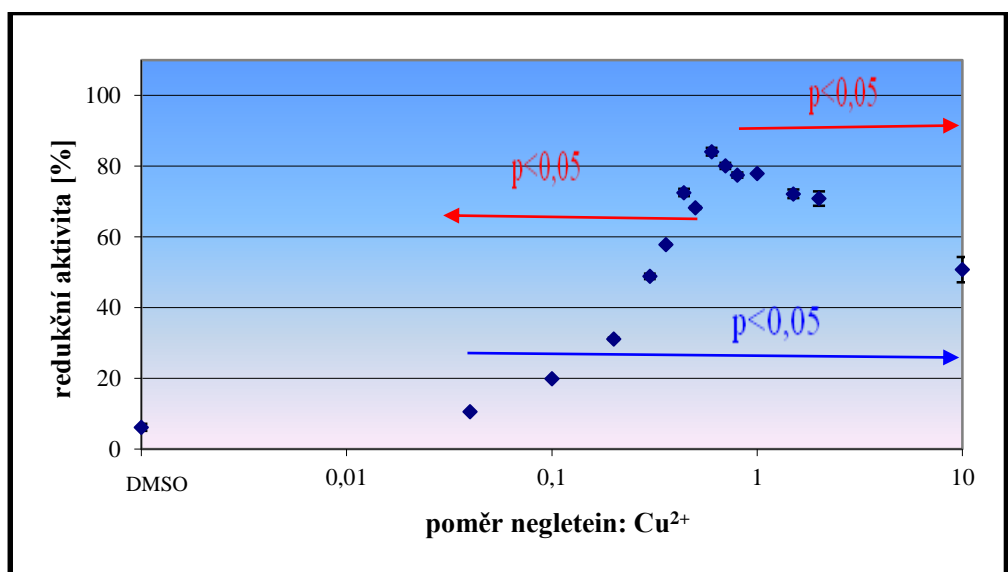


Obrázek 45. Redukční aktivita 5-hydroxyflavonu při pH 7.5 v čase 5 min

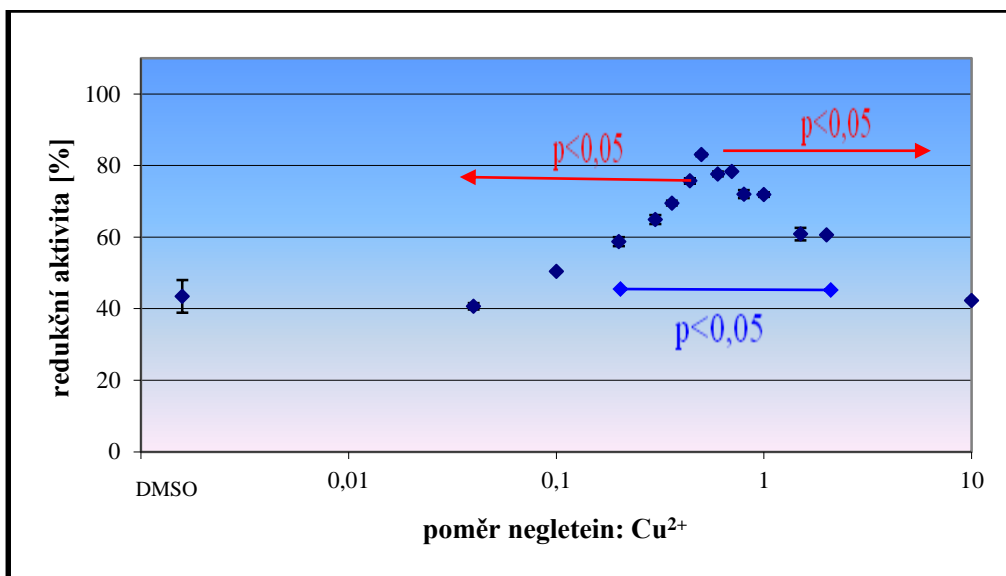
### 5.2.7. Redukční aktivita negleteinu



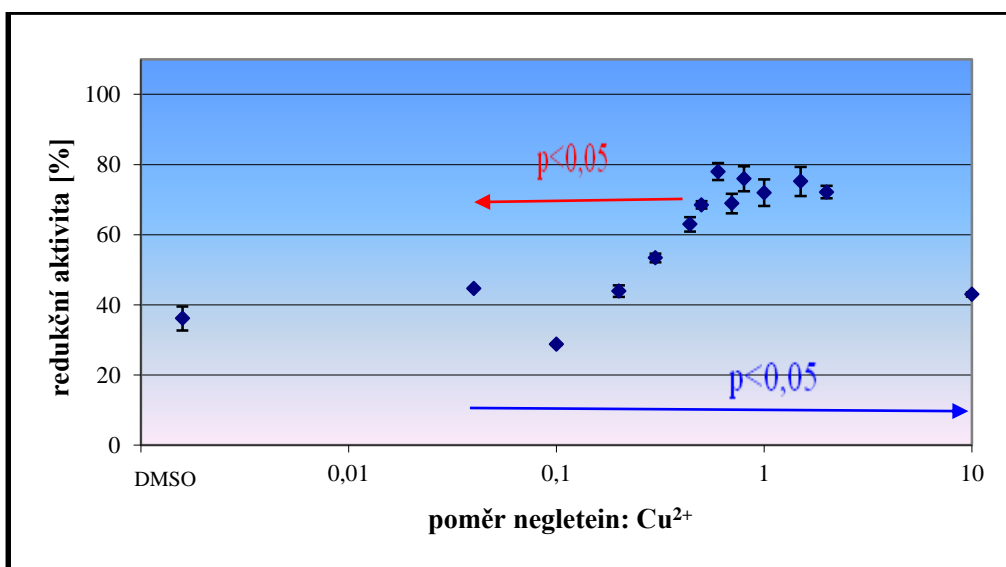
Obrázek 46. Redukční aktivita negleteinu při pH 4.5 v čase 5 min



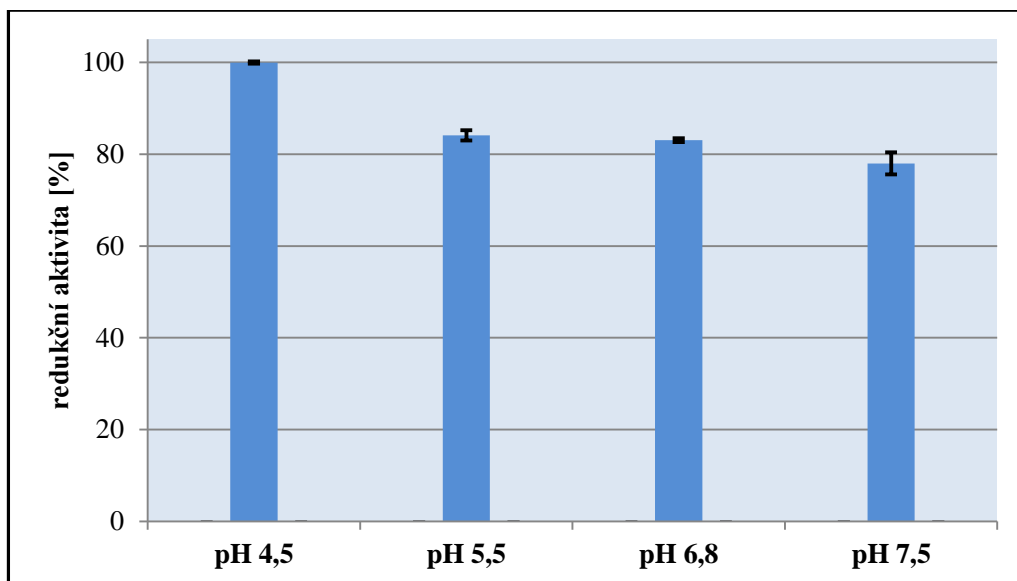
Obrázek 47. Redukční aktivita negleteinu při pH 5.5 v čase 5 min



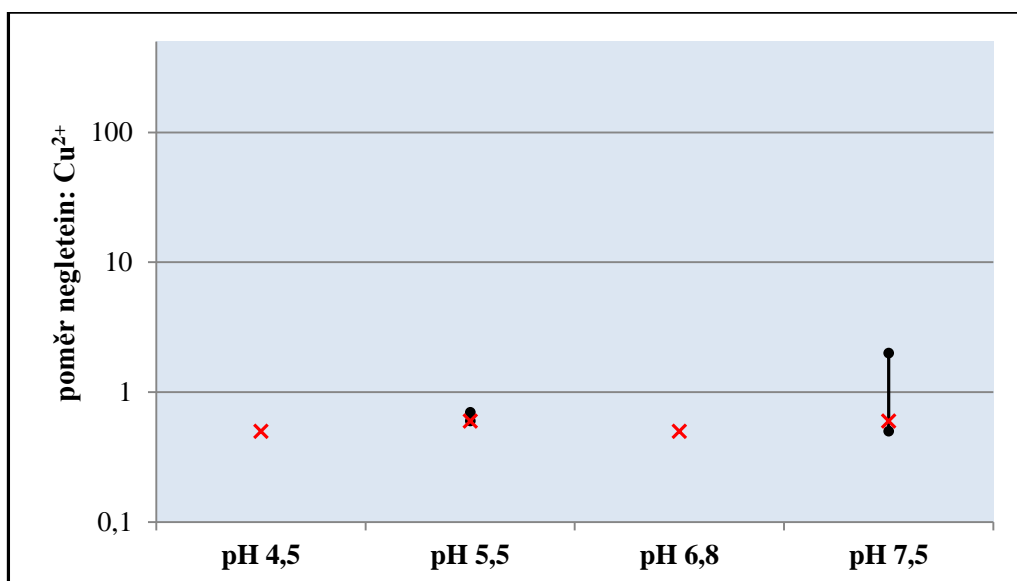
Obrázek 48. Redukční aktivita nigelleinu při pH 6.8 v čase 5 min



Obrázek 49. Redukční aktivita nigelleinu při pH 7.5 v čase 5 min

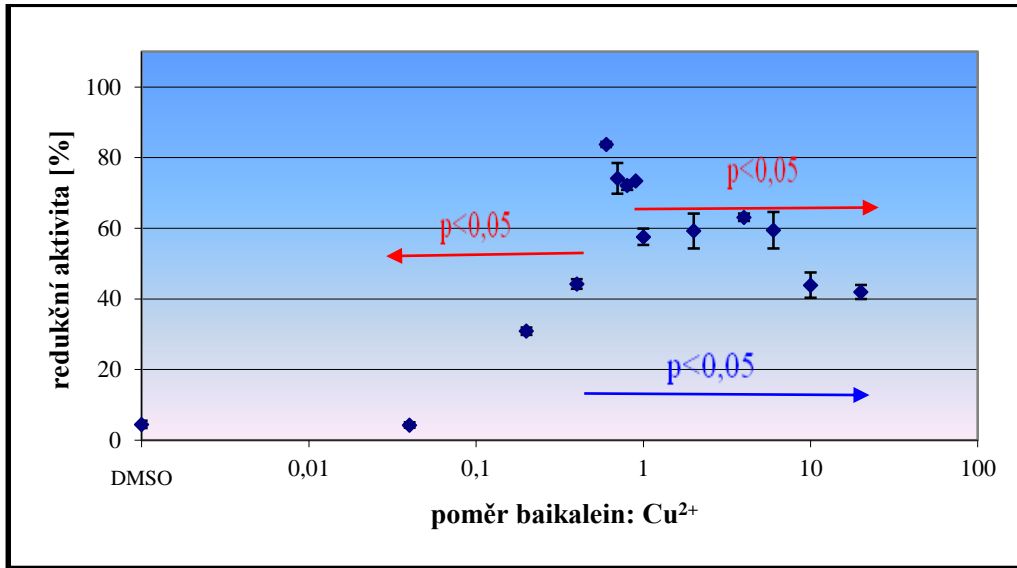


Obrázek 50. Dosažená redukční maxima negleiteinu v jednotlivých testovaných pH

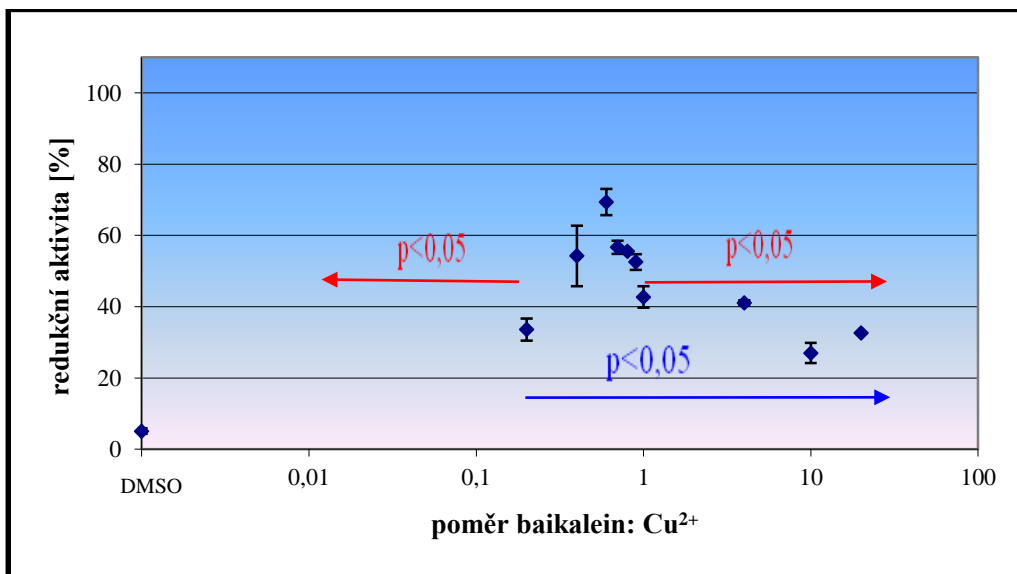


Obrázek 51. Koncentrační poměr negleiteinu a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity v jednotlivých testovaných pH

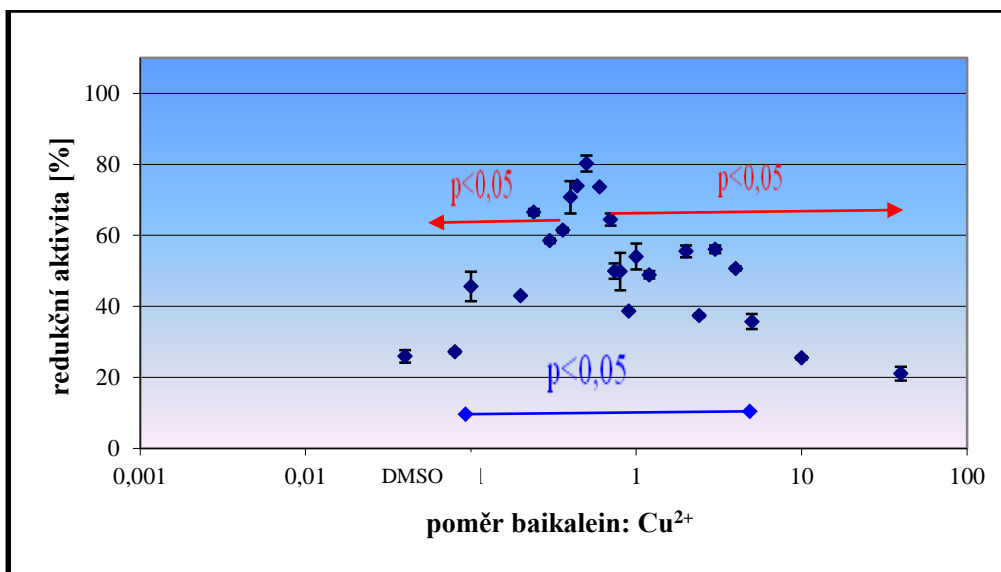
### 5.2.8. Redukční aktivita baikaleinu



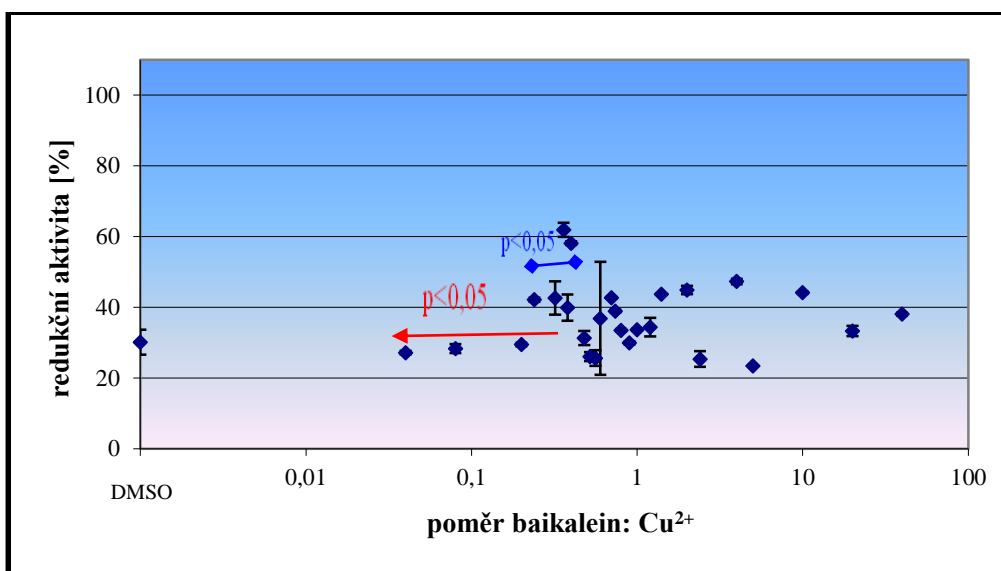
Obrázek 52. Redukční aktivita baikaleinu při pH 4.5 v čase 5 min



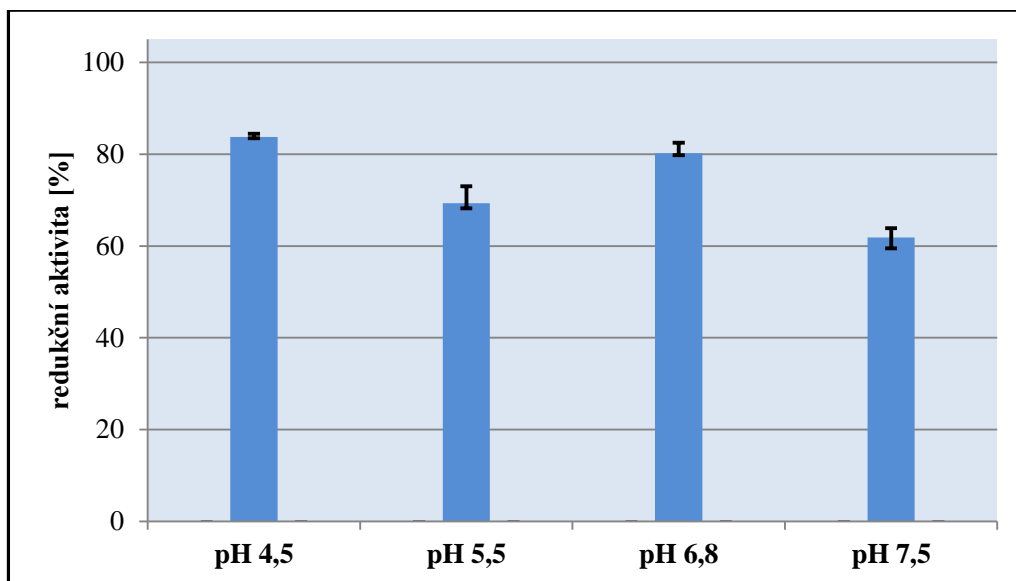
Obrázek 53. Redukční aktivita baikaleinu při pH 5.5 v čase 5 min



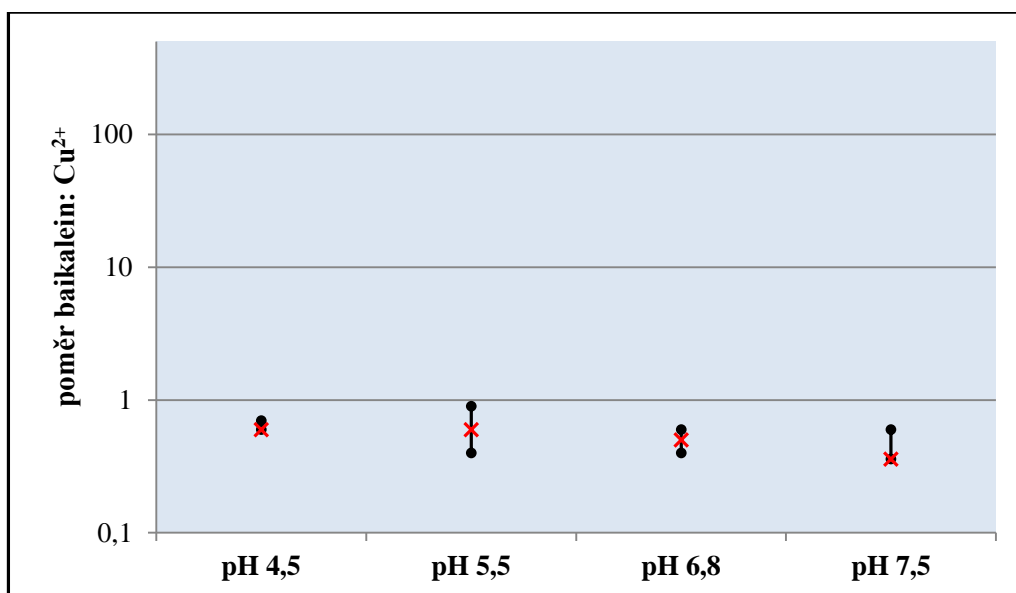
Obrázek 54. Redukční aktivita baikalainu při pH 6.8 v čase 5 min



Obrázek 55. Redukční aktivita baikalainu při pH 7.5 v čase 5 min



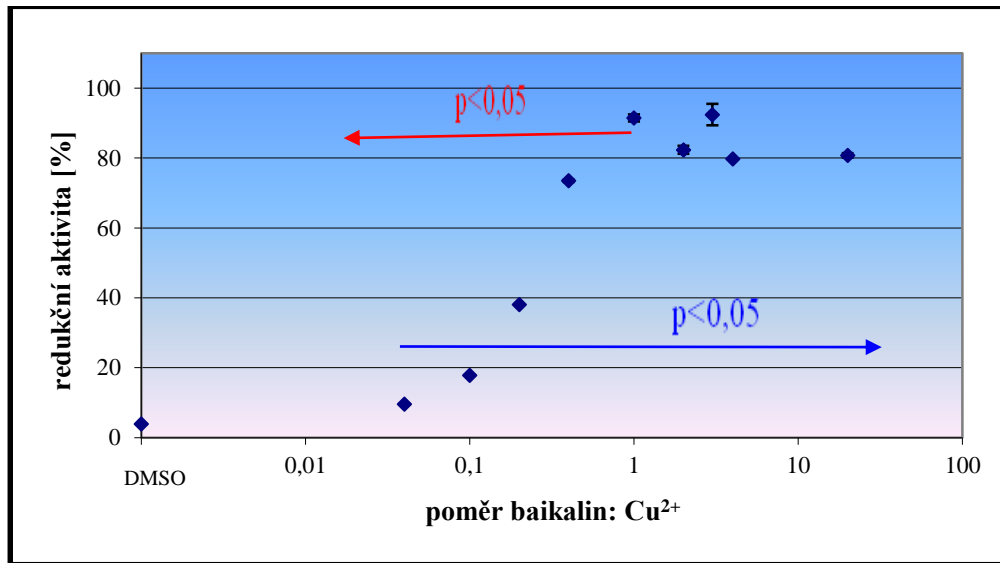
Obrázek 56. Dosažená redukční maxima baikaleinu v jednotlivých testovaných pH



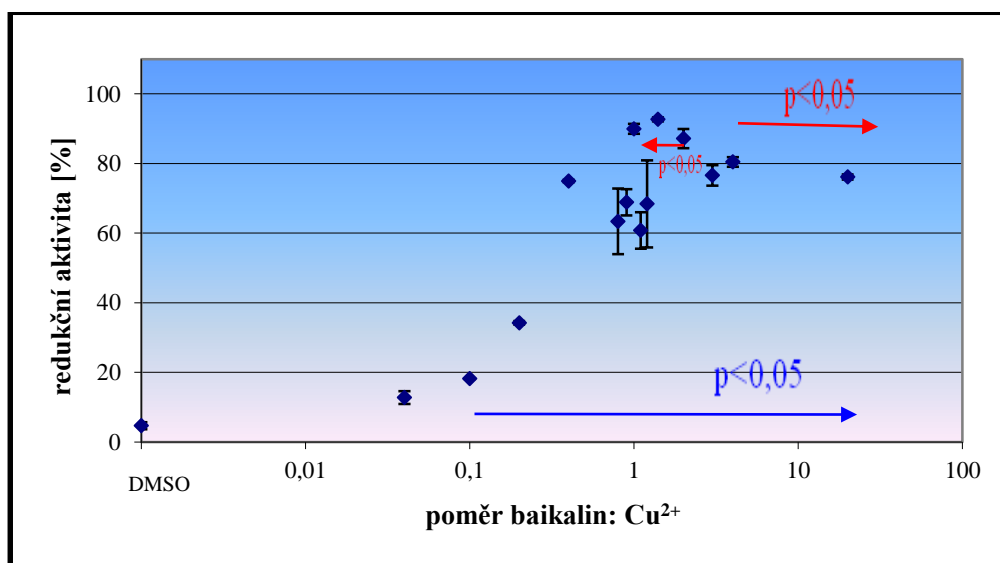
Obrázek 57. Koncentrační poměr baikaleinu a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity v jednotlivých testovaných pH



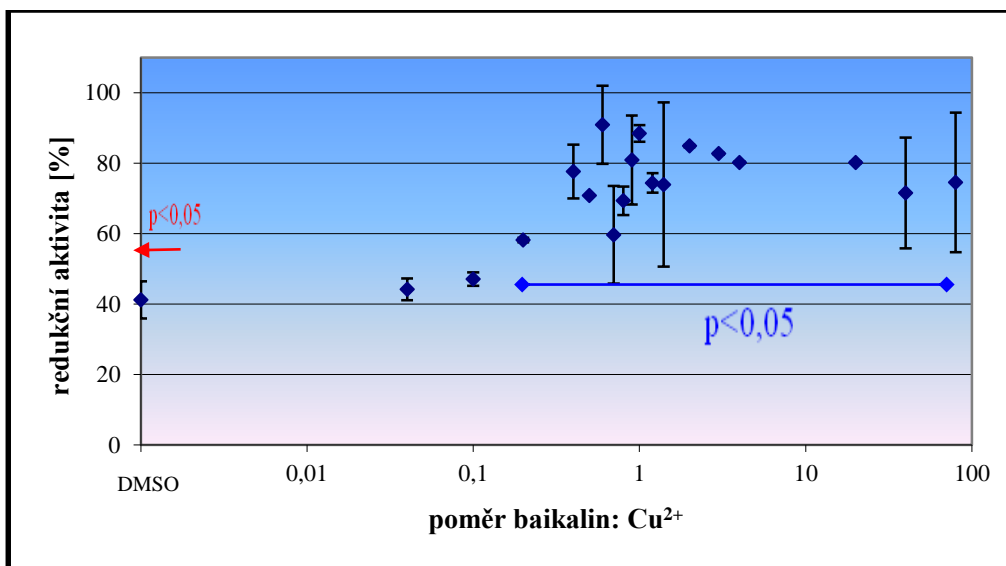
### 5.2.9. Redukční aktivita baikalinu



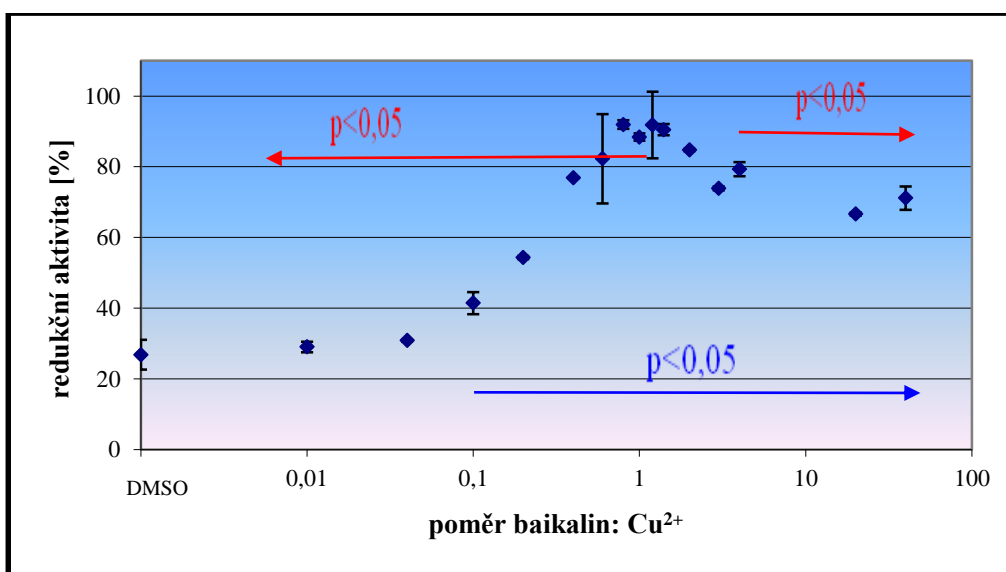
Obrázek 58. Redukční aktivita baikalinu při pH 4.5 v čase 5 min



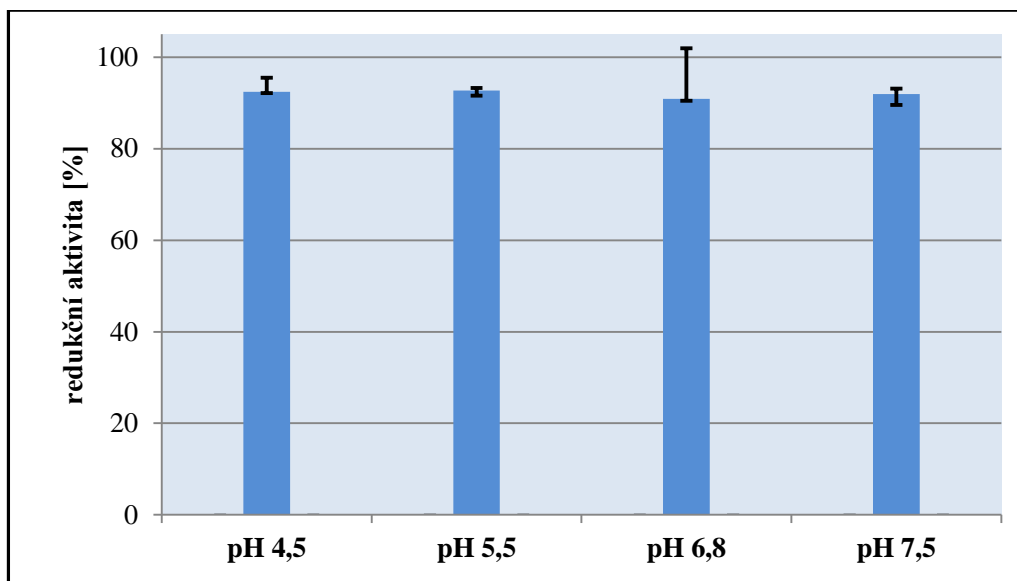
Obrázek 59. Redukční aktivita baikalinu při pH 5.5 v čase 5 min



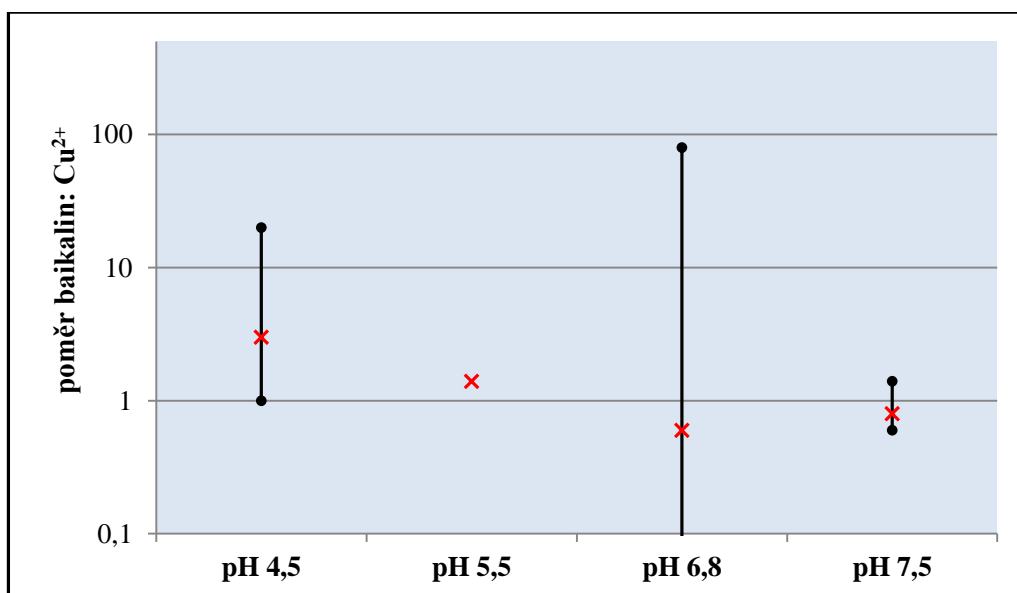
Obrázek 60. Redukční aktivita baicalinu při pH 6.8 v čase 5 min



Obrázek 61. Redukční aktivita baicalinu při pH 7.5 v čase 5 min

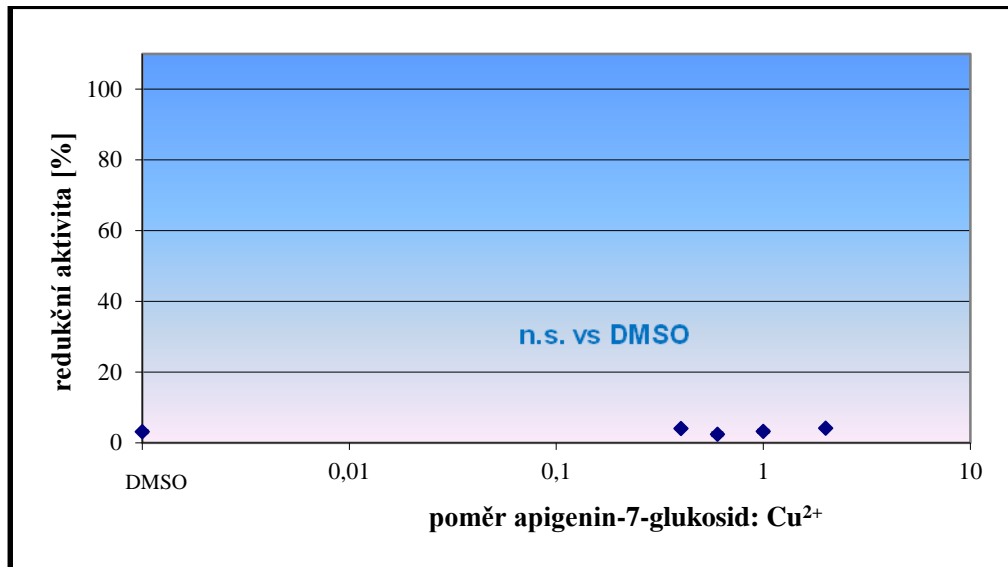


Obrázek 62. Dosažená redukční maxima baikalinu v jednotlivých testovaných pH

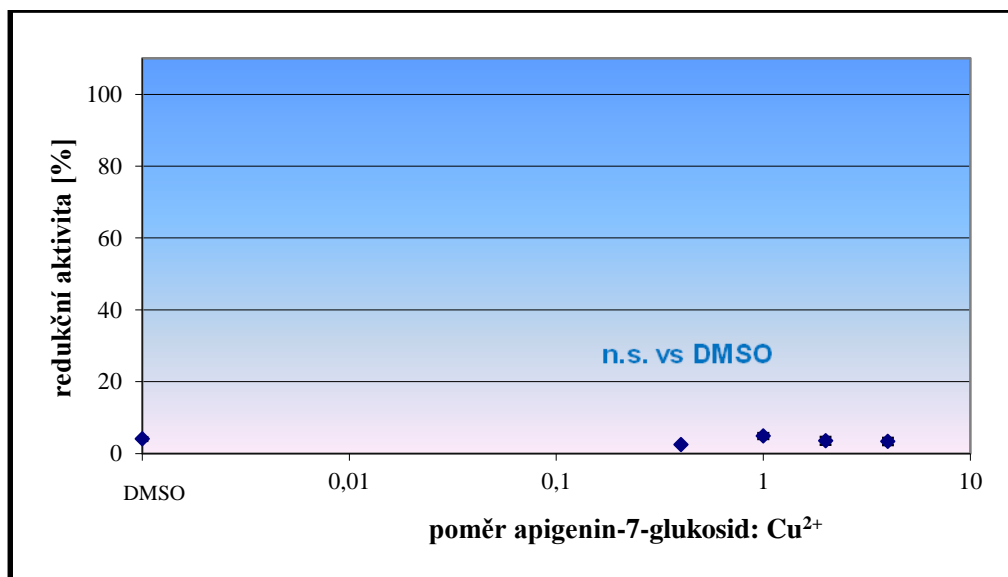


Obrázek 63. Koncentrační poměr baikalinu a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity v jednotlivých testovaných pH

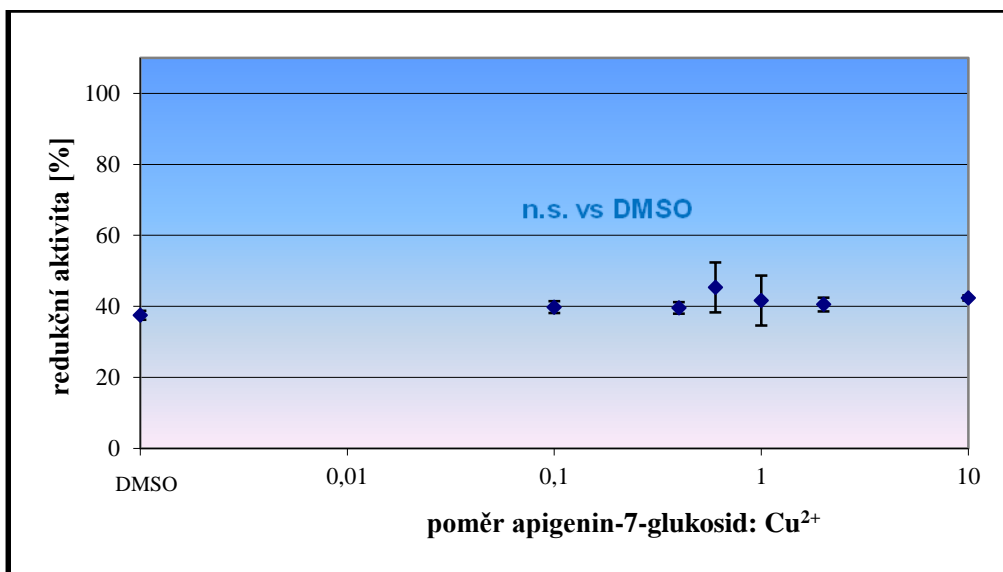
### 5.2.10. Redukční aktivita apigenin-7-glukosidu



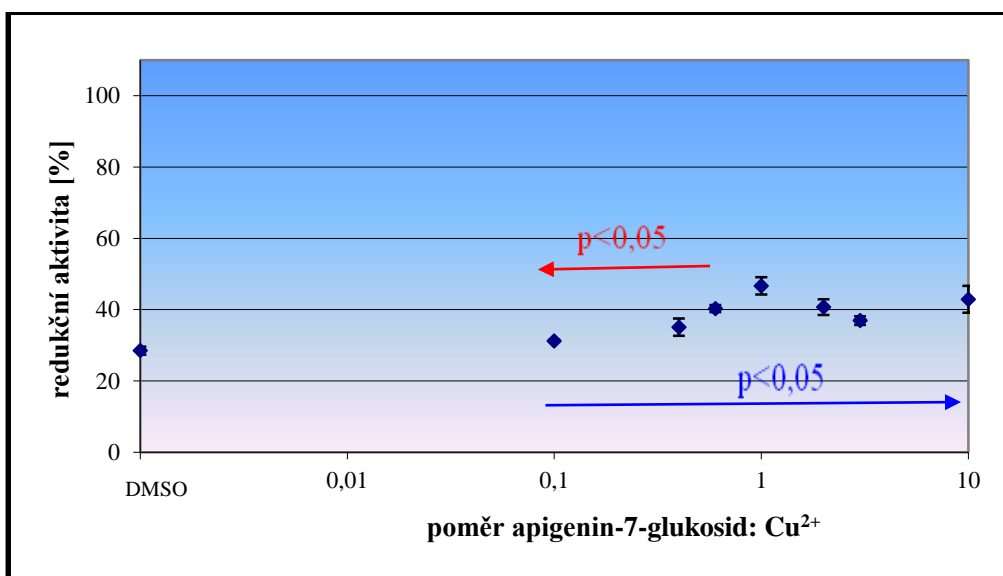
Obrázek 64. Redukční aktivita apigenin-7-glukosidu při pH 4.5 v čase 5 min



Obrázek 65. Redukční aktivita apigenin-7-glukosidu při pH 5.5 v čase 5 min

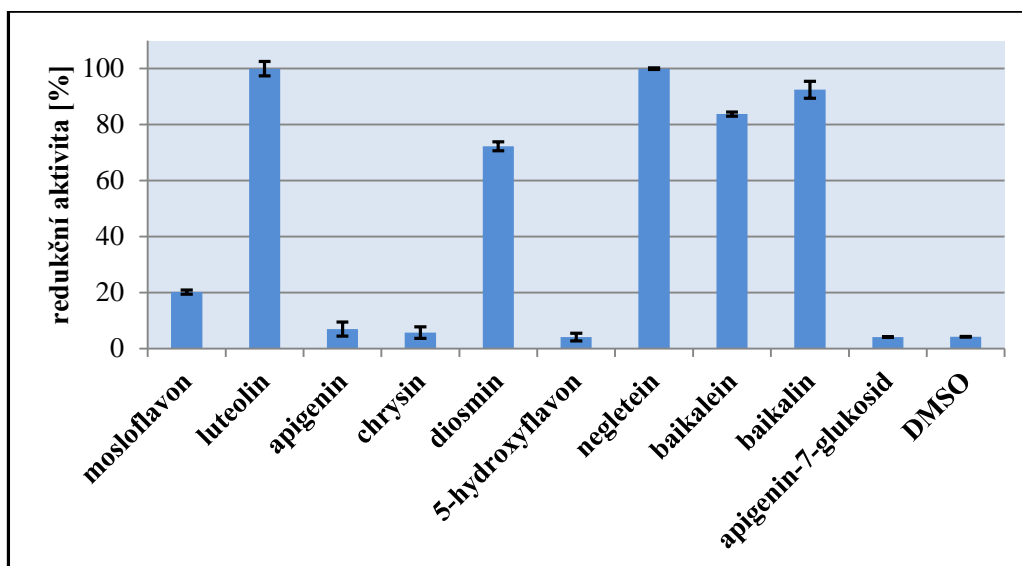


Obrázek 66. Redukční aktivita apigenin-7-glukosidu při pH 6.8 v čase 5 min

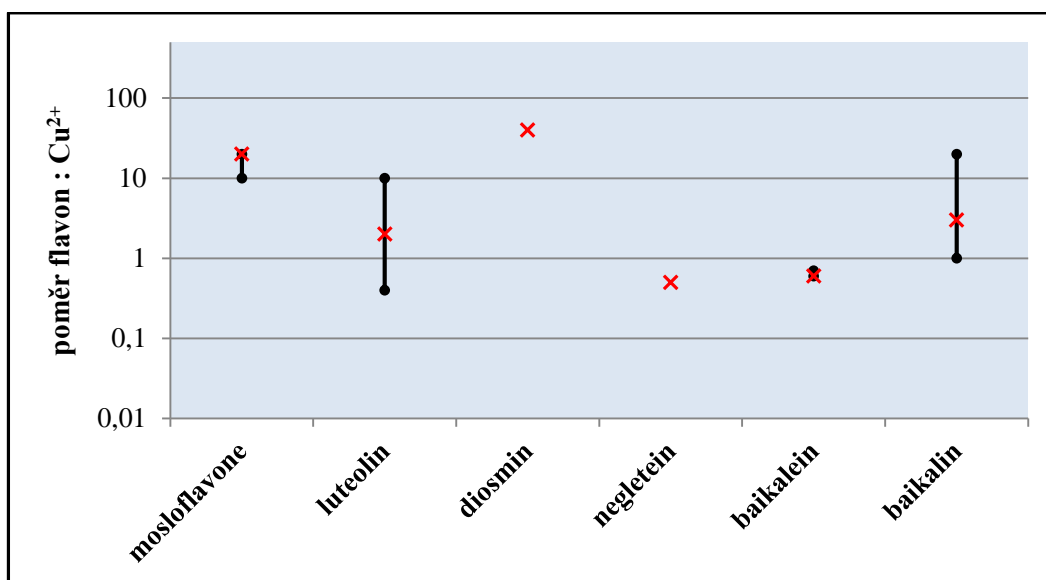


Obrázek 67. Redukční aktivita apigenin-7-glukosidu při pH 7.5 v čase 5 min

### 5.2.11. Redukční aktivita při pH 4.5



Obrázek 68. Dosažená redukční maxima jednotlivých flavonů při pH 4.5 v čase 5 min

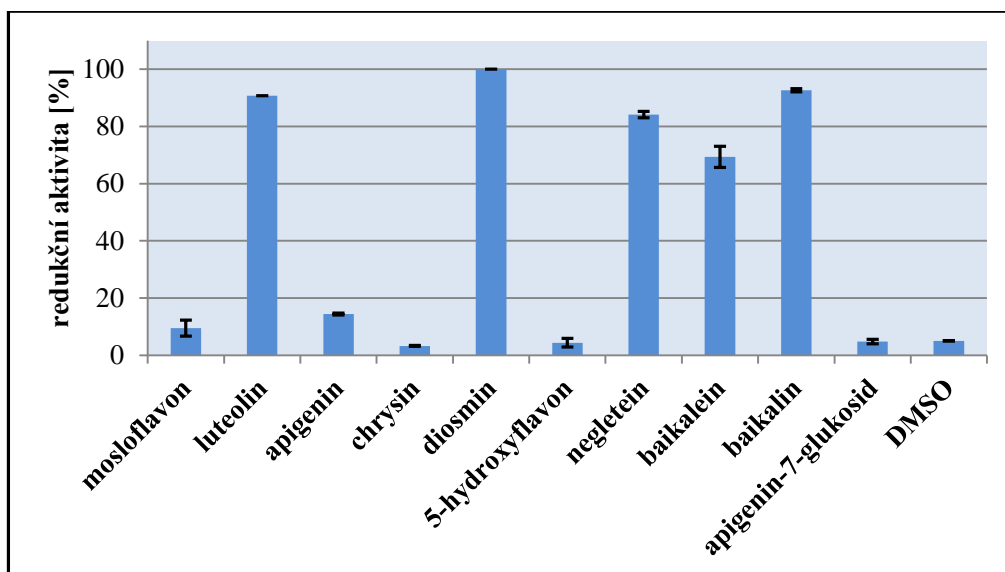


Obrázek 69. Koncentrační poměr jednotlivých flavonů a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity při pH 4.5 v čase 5 min

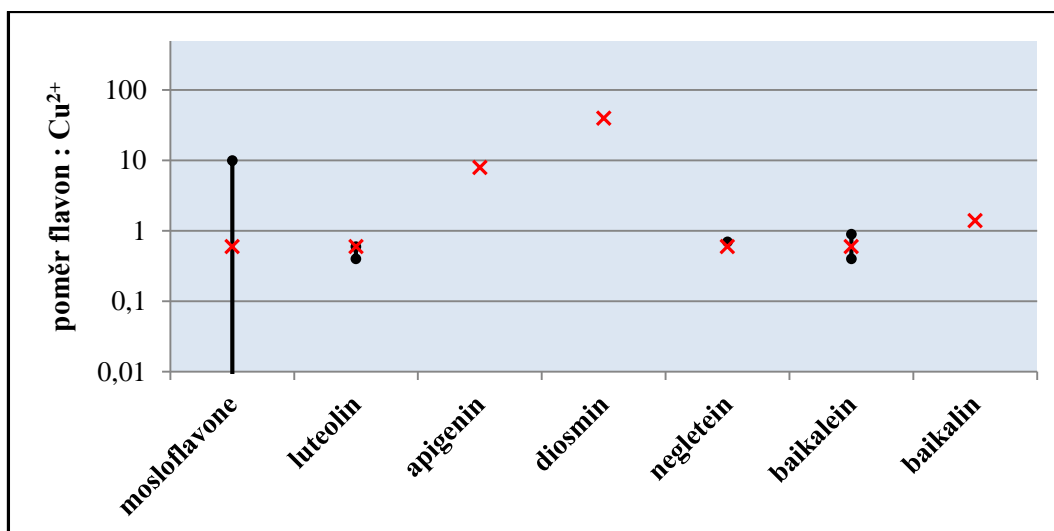
<b>Tukeyův test mnohonásobného porovnávání</b>	<b>pH 4.5</b>
mosloflavon vs. luteolin	p < 0.001
mosloflavon vs. apigenin	p < 0.001
mosloflavon vs. chrysin	p < 0.001
mosloflavon vs. diosmin	p < 0.001
mosloflavon vs. 5-hydroxyflavon	p < 0.001
mosloflavon vs. negletein	p < 0.001
mosloflavon vs. baikalein	p < 0.001
mosloflavon vs. baikalin	p < 0.001
mosloflavon vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
luteolin vs. apigenin	p < 0.001
luteolin vs. chrysin	p < 0.001
luteolin vs. diosmin	p < 0.001
luteolin vs. 5-hydroxyflavon	p < 0.001
luteolin vs. negletein	ns
luteolin vs. baikalein	p < 0.001
luteolin vs. baikalin	p < 0.01
luteolin vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
apigenin vs. chrysin	ns
apigenin vs. diosmin	p < 0.001
apigenin vs. 5-hydroxyflavon	ns
apigenin vs. negletein	p < 0.001
apigenin vs. baikalein	p < 0.001
apigenin vs. baikalin	p < 0.001
apigenin vs. apigenin-7-glukosid	ns
chrysin vs. diosmin	p < 0.001
chrysin vs. 5-hydroxyflavon	ns
chrysin vs. negletein	p < 0.001
chrysin vs. baikalein	p < 0.001
chrysin vs. baikalin	p < 0.001
chrysin vs. apigenin-7-glukosid	ns
diosmin vs. 5-hydroxyflavon	p < 0.001
diosmin vs. negletein	p < 0.001
diosmin vs. baikalein	p < 0.001
diosmin vs. baikalin	p < 0.001
diosmin vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. negletein	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. baikalein	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. baikalin	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. apigenin-7-glukosid	ns
negletein vs. baikalein	p < 0.001
negletein vs. baikalin	p < 0.01
negletein vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
baikalein vs. baikalin	p < 0.001
baikalein vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
baikalin vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
baikalin vs. DMSO	p < 0.001

Tabulka 2. Statistické porovnání maximálních redukčních potenciálů testovaných látek při pH 4.5

### 5.2.12. Redukční aktivita při pH 5.5



Obrázek 70. Dosažená redukční maxima jednotlivých flavonů při pH 5.5 v čase 5 min



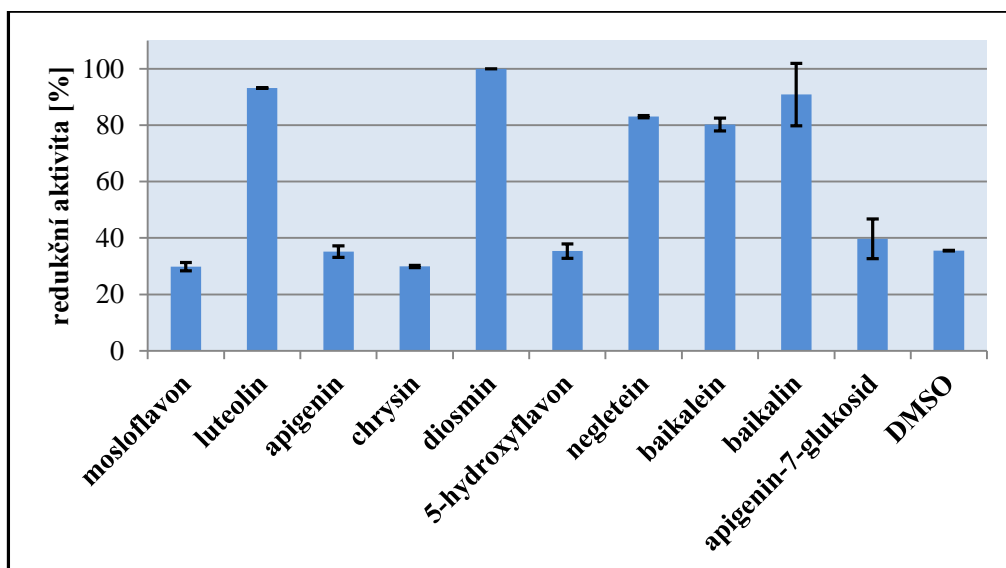
Obrázek 71. Koncentrační poměr jednotlivých flavonů a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity při pH 5.5 v čase 5 min



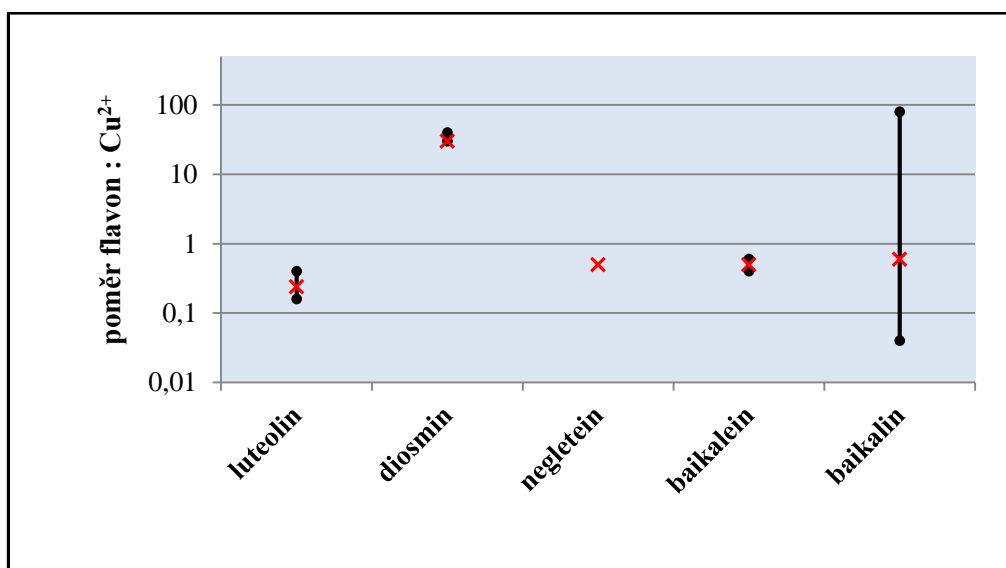
<b>Tukeyův test mnohonásobného porovnávání</b>	<b>pH 5.5</b>
mosloflavon vs. luteolin	p < 0.001
mosloflavon vs. apigenin	p < 0.001
mosloflavon vs. chrysin	p < 0.001
mosloflavon vs. diosmin	p < 0.001
mosloflavon vs. 5-hydroxyflavon	p < 0.001
mosloflavon vs. negletein	p < 0.001
mosloflavon vs. baikalein	p < 0.001
mosloflavon vs. baikalin	p < 0.001
mosloflavon vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
luteolin vs. apigenin	p < 0.001
luteolin vs. chrysin	p < 0.001
luteolin vs. diosmin	p < 0.001
luteolin vs. 5-hydroxyflavon	p < 0.001
luteolin vs. negletein	ns
luteolin vs. baikalein	p < 0.001
luteolin vs. baikalin	p < 0.01
luteolin vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
apigenin vs. chrysin	ns
apigenin vs. diosmin	p < 0.001
apigenin vs. 5-hydroxyflavon	ns
apigenin vs. negletein	p < 0.001
apigenin vs. baikalein	p < 0.001
apigenin vs. baikalin	p < 0.001
apigenin vs. apigenin-7-glukosid	ns
chrysin vs. diosmin	p < 0.001
chrysin vs. 5-hydroxyflavon	p < 0.001
chrysin vs. negletein	p < 0.001
chrysin vs. baikalein	p < 0.001
chrysin vs. baikalin	p < 0.001
chrysin vs. apigenin-7-glukosid	ns
diosmin vs. 5-hydroxyflavon	p < 0.001
diosmin vs. negletein	p < 0.001
diosmin vs. baikalein	p < 0.001
diosmin vs. baikalin	p < 0.001
diosmin vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. negletein	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. baikalein	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. baikalin	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. apigenin-7-glukosid	ns
negletein vs. baikalein	p < 0.001
negletein vs. baikalin	p < 0.01
negletein vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
baikalein vs. baikalin	p < 0.001
baikalein vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
baikalin vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001

Tabulka 3. Statistické porovnání maximálních redukčních potenciálů testovaných látek při pH 5.5

### 5.2.13. Redukční aktivita při pH 6.8



Obrázek 72. Dosažená redukční maxima jednotlivých flavonů při pH 6.8 v čase 5 min

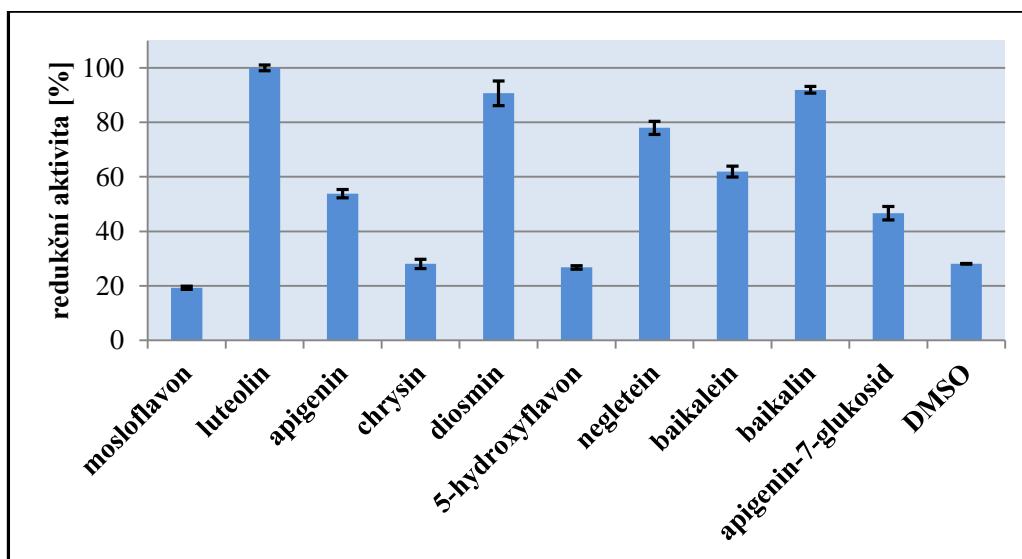


Obrázek 73. Koncentrační poměr jednotlivých flavonů a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity při pH 6.8 v čase 5 min

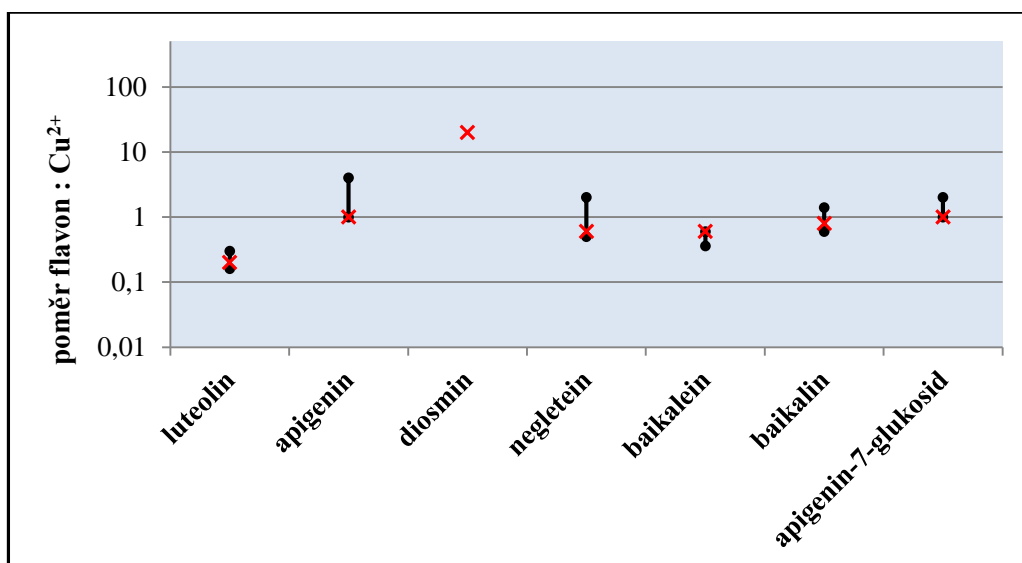
<b>Tukeyův test mnohonásobného porovnávání</b>	<b>pH 6.8</b>
mosloflavon vs. luteolin	p < 0.001
mosloflavon vs. apigenin	ns
mosloflavon vs. chrysin	ns
mosloflavon vs. diosmin	p < 0.001
mosloflavon vs. 5-hydroxyflavon	ns
mosloflavon vs. negletein	p < 0.001
mosloflavon vs. baikalein	p < 0.001
mosloflavon vs. baikalin	p < 0.001
mosloflavon vs. apigenin-7-glukosid	ns
luteolin vs. apigenin	p < 0.001
luteolin vs. chrysin	p < 0.001
luteolin vs. diosmin	ns
luteolin vs. 5-hydroxyflavon	p < 0.001
luteolin vs. negletein	ns
luteolin vs. baikalein	ns
luteolin vs. baikalin	ns
luteolin vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
apigenin vs. chrysin	ns
apigenin vs. diosmin	p < 0.001
apigenin vs. 5-hydroxyflavon	ns
apigenin vs. negletein	p < 0.001
apigenin vs. baikalein	p < 0.001
apigenin vs. baikalin	p < 0.001
apigenin vs. apigenin-7-glukosid	ns
chrysin vs. diosmin	p < 0.001
chrysin vs. 5-hydroxyflavon	ns
chrysin vs. negletein	p < 0.001
chrysin vs. baikalein	p < 0.001
chrysin vs. baikalin	p < 0.001
chrysin vs. apigenin-7-glukosid	ns
diosmin vs. 5-hydroxyflavon	p < 0.001
diosmin vs. negletein	p < 0.01
diosmin vs. baikalein	p < 0.01
diosmin vs. baikalin	ns
diosmin vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. negletein	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. baikalein	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. baikalin	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. apigenin-7-glukosid	ns
negletein vs. baikalein	ns
negletein vs. baikalin	ns
negletein vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
baikalein vs. baikalin	ns
baikalein vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
baikalin vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001

Tabulka 4. Statistické porovnání maximálních redukčních potenciálů testovaných látek při pH 6.8

### 5.2.14. Redukční aktivita při pH 7.5



Obrázek 74. Dosažená redukční maxima jednotlivých flavonů při pH 7.5 v čase 5 min



Obrázek 75. Koncentrační poměr jednotlivých flavonů a měďnatých iontů odpovídající hodnotám maximální redukční aktivity při pH 7.5 v čase 5 min

<b>Tukeyův test mnohonásobného porovnávání</b>	<b>pH 7.5</b>
mosloflavon vs. luteolin	p < 0.001
mosloflavon vs. apigenin	p < 0.001
mosloflavon vs. chrysin	p < 0.01
mosloflavon vs. diosmin	p < 0.001
mosloflavon vs. 5-hydroxyflavon	p < 0.05
mosloflavon vs. negletein	p < 0.001
mosloflavon vs. baikalein	p < 0.001
mosloflavon vs. baikalin	p < 0.001
mosloflavon vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
luteolin vs. apigenin	p < 0.001
luteolin vs. chrysin	p < 0.001
luteolin vs. diosmin	p < 0.01
luteolin vs. 5-hydroxyflavon	p < 0.001
luteolin vs. negletein	p < 0.001
luteolin vs. baikalein	p < 0.001
luteolin vs. baikalin	p < 0.01
luteolin vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
apigenin vs. chrysin	p < 0.001
apigenin vs. diosmin	p < 0.001
apigenin vs. 5-hydroxyflavon	p < 0.001
apigenin vs. negletein	p < 0.001
apigenin vs. baikalein	p < 0.01
apigenin vs. baikalin	p < 0.001
apigenin vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.05
chrysin vs. diosmin	p < 0.001
chrysin vs. 5-hydroxyflavon	ns
chrysin vs. negletein	p < 0.001
chrysin vs. baikalein	p < 0.001
chrysin vs. baikalin	p < 0.001
chrysin vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
diosmin vs. 5-hydroxyflavon	p < 0.001
diosmin vs. negletein	p < 0.001
diosmin vs. baikalein	p < 0.001
diosmin vs. baikalin	ns
diosmin vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. negletein	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. baikalein	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. baikalin	p < 0.001
5-hydroxyflavon vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
negletein vs. baikalein	p < 0.001
negletein vs. baikalin	p < 0.001
negletein vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
baikalein vs. baikalin	p < 0.001
baikalein vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001
baikalin vs. apigenin-7-glukosid	p < 0.001

Tabulka 5. Statistické porovnání maximálních redukčních potenciálů testovaných látek při pH 7.5

## 6. Diskuze

Flavonoidy jsou fenolické sloučeniny, které se běžně vyskytují v lidské stravě. Mají široké spektrum biologických účinků, nejvyšší význam byl původně připisován antioxidační aktivitě, ale dnes se ukazuje, že mají i jiné „ne-antioxidační“ účinky. Jsou spojovány s antihistaminovými, antivirovými, antiproliferativními účinky nebo protizánětlivou a antikancerogenní aktivitou (Yao et al. 2004). Díky pozitivním vlastnostem flavonoidů se studuje jejich potenciální využití v terapii různých chorob.

Flavony, jedna z mnoha tříd flavonoidů, jsou důležité rostlinné zdroje, které se nachází v zelenině a ovoci. Mají široké terapeutické využití zejména díky antioxidačnímu potenciálu a vlivu na enzymatický systém. Poslední studie naznačují pozitivní efekt na nemoci spojené s oxidačním stresem (Singh et al. 2014).

Cílem této rigorózní práce bylo stanovit redukční aktivitu vybraných flavonů při různých pH. Pro stanovení redukční aktivity byla použita metoda mikrotitrace za pomoci indikátoru disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny. K vyhodnocení absorbancí došlo na základě spektrofotometrické analýzy. Hodnocenými flavony byly mosloflavon, luteolin, apigenin, chrysin, diosmin, 5-hydroxyflavon, baikalein, baikalin, negletein, apigenin-7-glukosid.

Mosloflavon vykazoval schopnost redukovat měďnaté ionty pouze při pH 4.5 a 5.5. Dosažená redukční maxima při těchto dvou pH jsou velmi odlišná, při pH 4.5 dosahuje mosloflavon hodnoty 20 %, nicméně při pH 5.5 maximální redukce odpovídá hodnotě pouhých 9 %. Redukční aktivita se snižuje se zvyšováním pH. Dokonce při pH 6.8 byl mosloflavon schopen významně snížit redukci měďnatých iontů způsobenou indikátorem. Schopnost redukční aktivity mosloflavonu hodnotím jako nevýznamnou. Z hlediska struktury to může být způsobeno přítomností pouze jedné hydroxyskupiny v poloze 5 na kruhu A, neboť ostatní hydroxyskupiny v poloze 6, 7 na kruhu A jsou methylovány a tudíž blokovány pro další reakce. Nicméně i tyto methoxyskupiny mají určitý význam, neboť 5-hydroxyflavon není schopen redukce v žádném hodnoceném pH. Redukční vlastnosti zde může snižovat i schopnost chelatace, čemuž může napovídat i klesající křivka při pH 6.8.

Schopnost luteolinu redukovat měďnaté ionty se blíží hodnotě 100 % ve všech testovaných pH, a to v podobném koncentračním poměru luteolin:Cu<sup>2+</sup> často nižším než 1:1. Při pH 4.5 je tato aktivita nejvyšší, dosahuje hodnoty 99,9 ± 2,6 %. Naopak při pH 5.5 je redukční aktivita luteolinu nejnižší, tvoří 90,7 %. Přítomnost čtyř volných hydroxylových skupin v polohách 3', 4', 5 a 7 luteolinu významně zvýšila redukční aktivitu, a to u některých pH již při nižší koncentraci testovaného flavonu.

Dalším flavonem je apigenin, jeho redukční aktivita je nejvyšší při pH 7.5, kdy tato hodnota dosahuje 53,81 ± 1,5 %. Při pH 4.5 je jeho redukční aktivita nejnižší, tato hodnota tvoří méně než 10 %. A nakonec při pH 6.8 tento flavon nemá žádné maximum, redukční aktivita není výraznější než tato schopnost u rozpouštědla dimethylsulfoxidu. Apigenin oproti luteolinu neobsahuje jednu hydroxylovou skupinu v poloze 3' na kruhu B a to se výrazně projevilo na poklesu jeho redukční schopnosti.

Chrysin byl schopen redukovat měďnaté ionty na měďné pouze při pH 4.5. Ale i v tomto pH byla jeho redukční aktivita velmi nízká, pohybovala se na hodnotě 5,7 ± 2,0 %. Chrysin má hydroxyskupinu v poloze 5 a 7, skupina v poloze 5 se může zapojit do chelatace a hydroxylová skupina v poloze 7 nemá na redukci významný vliv.

Vysokou redukční aktivitu vykazoval diosmin. Jeho schopnost redukovat měďnaté ionty se projevila ve všech hodnocených pH v převažujícím koncentračním poměru okolo 40:1 v rozmezí hodnot od 72 do 100 %. Nejnižší se pohybovala právě při pH 4.5, kde tato hodnota dosáhla 72,2 ± 1,6. Hodnoty 100 % se dosáhlo hned u dvou pH: 5.5 a 6.8. Diosmin má čtyři hydroxylové skupiny. Jedna hydroxylová skupina v poloze 7 je glykosylována objemnými glykosidy, jedna hydroxylová skupina v poloze 3' je methylována. Právě tato methylace působí blokování hydroxyskupiny na kruhu B, a to může vést právě k nutnosti zvyšování koncentračního poměru potřebného k dosažení 100% redukční aktivity. Navíc dle Macákové et al. (2012) některé flavonoidy ve vyšších koncentracích působí nevýznamně jako antioxidanty, spíše mají prooxidační vlastnosti.

Naproti tomu 5-hydroxyflavon nevykazoval redukční aktivitu ani v jednom z testovaných pH. To může být způsobeno přítomností pouze jedné hydroxyskupiny v poloze 5 na kruhu A. Tuto skutečnost si vysvětlují jako možné zapojení 5-hydroxyskupiny do chelatace spolu s 4-oxoskupinou (Mladěnka et al. 2011).

U negleteinu se projevila redukční schopnost ve všech stanovovaných pH, dosahovala hodnot v rozmezí od 77 do 99 % v blízkosti poměru 1:1. Nejvyšší redukční aktivita byla při pH 4.5, kdy dosáhla hodnoty  $100,0 \pm 0,3$  %. V podmínkách pH 5.5 a 6.8 hodnota přesahuje 80 %. Nejnižší schopnost redukce měďnatých iontů byla při pH 7.5, kdy hodnota tvořila  $78,0 \pm 2,4$  %. Zde si lze opět všimnout posoupnosti snižování redukční schopnosti v závislosti na zvyšování pH. Negletein je 5,6-dihydroxy-7-methoxyflavon, obsahuje pouze dvě volné hydroxyskupiny na kruhu A a další je methylována. Vysoká redukční schopnost ve všech pH může být způsobena stérickým bráněním objemné methoxyskupiny a tudíž hydroxylová skupina v poloze 6 zůstane volná pro redukční schopnosti tohoto flavonu. Jeho nezvykle vysoké redukční aktivity si lze všimnout i na grafu zejména při pH 6.8, kde je vidět zvonovitý tvar, na jehož konci vidíme protáhlý tvar k nižším hodnotám redukce než na jeho počátku. I v literatuře lze nalézt, že zvonovitý tvar křivky ukazuje na prooxidační vlastnosti (Macáková et al. 2012).

Baikalein vykazuje redukční schopnosti ve všech hodnocených pH v podobném koncentračním poměru v blízkosti 1:1. Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo při pH 4.5, kdy hodnota byla  $83,7 \pm 0,7$  %. Naopak nejnižší hodnota byla při pH 7.5 61 %. Baikalein má tři volné hydroxylové skupiny v poloze 5, 6 a 7. V závislosti na zjištění nižší redukční schopnosti než u baikalinu, se můžu domnívat, že jeho hydroxyskupiny mohou být výrazně zapojeny do chelatace a tím se může snižovat redukční aktivita.

Schopnost redukční aktivity baikalinu byla vysoká, ve všech pH přesáhla hodnotu 90 % v podobném koncentračním poměru v blízkosti 1:1. Nejnižše se pohybovala právě při pH 6.8, kde tato hodnota dosáhla 90,9 %. Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo při pH 5.5, kdy hodnota byla 92,7 %. Baikalin má také tři hydroxylové skupiny, ale oproti baikaleinu je skupina v poloze 7 blokována objemným glykosidem, tudíž se může zvýhodňovat schopnost chelatace pouze hydroxyskupiny v poloze 5 spolu s ketoskupinou v poloze 4, a volná hydroxyskupina v poloze 6 může být významněji zapojena do redukce. Baikalin vykazuje strukturní podobnost s negleteinem. Dá se říci, že i jejich redukční aktivita je podobná.

Apigenin-7-glukosid vykazoval velice nízkou redukční aktivitu při pH 4.5, 5.5 i při 7.5, v pH 6.8 nebyla jeho schopnost redukovat měďnaté ionty vyšší než u rozpouštědla dimethylsulfoxidu, který byl testován pro negativní kontrolu. Nejnižší



aktivita byla pozorována při pH 4.5 s hodnotou  $4,1 \pm 0,1$  %, nejvyšší hodnota  $46,7 \pm 2,4$  % byla při pH 7.5. Tento flavon má volné hydroxyskupiny v poloze 4' a 5 a další glykosylovanou hydroxyskupinu v poloze 7. Stejně jako u aglykonu apigeninu se na nižší redukční aktivitě může podílet fakt, že je na kruhu B pouze jedna hydroxylová skupina. Ta se může podílet na antioxidační aktivitě. Dle Heim et al. (2002) nejvýznamnější antioxidační aktivita přísluší právě OH skupinám na kruhu B.

Z výsledků je tedy patrné, že při pH 4.5 bylo nejvyšší redukční aktivity dosaženo u luteolinu a negleteinu v koncentračním poměru blízcím se 1:1 u obou flavonů hodnoty 99 %. Naopak v tomto pH apigenin-7-glukosid, apigenin, chrysin a 5-hydroxyflavon neprojevíly redukční potenciál.

Při pH 5.5 diosmin vykazoval nejvyšší redukční aktivitu s hodnotou 100 %, avšak při vyšším koncentračním poměru dosahujícím až k 40:1 diosmin:Cu<sup>2+</sup>. Následován byl baikalinem a luteolinem, kde se redukční schopnost pohybovala v rozmezí 90-93 % v koncentračním poměru okolo 1:1. Chrysin, 5-hydroxyflavon, mosloflavon ani apigenin-7-glukosid neprojevíly při daném pH redukční aktivitu.

Redukční aktivita při pH 6.8 byla nejvyšší u diosminu, baikalinu a luteolinu, aktivita se pohybovala v rozmezí hodnot 90-100 %. Při tomto pH nevykazovaly redukční potenciál tyto flavony: mosloflavon, apigenin, chrysin, 5-hydroxyflavon a apigenin-7-glukosid. Ostatní flavony dosáhly hodnot nad 80 %.

Nejvyšší redukční aktivity při pH 7.5 dosáhl luteolin a baikalin v rozmezí hodnot 91-99 % při koncentračním poměru okolo 1:1. Diosmin dosáhl hodnoty 90 %, ale při vyšším koncentračním poměru než luteolin a baikalin. Při pH 7.5 nevykazoval redukční aktivitu mosloflavon, chrysin a 5-hydroxyflavon. Ostatní flavony dosáhly redukční aktivity v rozmezí hodnot 46-77 % v koncentračním poměru v blízkosti nebo při poměru 1:1.

V této experimentální práci bylo potvrzeno, že redukční aktivita flavonů závisí na jejich struktuře a pH prostředí. Tato skutečnost se shoduje s publikovými studiemi, i když redukce je stále ještě málo publikovaným tématem. Lze říci, že většinou se při snižování pH schopnost redukce měďnatých iontů zvyšovala. Z hlediska struktury bylo zjištěno, že redukční potenciál souvisí s počtem a zejména lokalizací hydroxylových skupin. Vyšší redukční aktivita souvisí s přítomností dvou OH skupin na kruhu A

(volná hydroxylová skupina v poloze 6 a zároveň substituovaná OH skupina v poloze 7) nebo B (luteolin). Flavony obsahující tyto funkční skupiny redukují z této skupiny látek nejvýrazněji a to již při nízkých koncentračních poměrech. Je nutno zmínit, že mezi zmíněnou substitucí v kruhu A i B je velký rozdíl. Luteolin s katecholickým kruhem B dosahuje vysokého stupně redukce, který se jen málo liší s dalším přídatkem této látky. Naopak baicalein i negletein s volnými 5,6-dihydroxyskupinami po dosažení maxima redukce s dalším přídatkem flavonu snižují procento redukované mědi. Vysvětlení bude spočívat v rozdílném chelatačním potenciálu těchto látek (Říha et al. 2014). Vliv dvojných vazeb a ketoskupiny nelze v tomto souboru látek logicky zhodnotit, neboť všechny testované látky (flavony) mají tento základní skelet a ani nelze tento vztah porovnat s dostupnou literaturou. Vliv těchto funkčních skupin osvětlí až další podobně koncipované studie.

## 7. Závěr

V rámci této rigorózní práce jsem stanovovala redukční aktivitu flavonů za pomoci spektrofotometrické metody. Hodnocenými flavony byly mosloflavon, luteolin, apigenin, chrysin, diosmin, 5-hydroxyflavon, baikalein, baikalin, negletein, apigenin-7-glukosid.

Nejvýznamnější redukční aktivita byla zjištěna u luteolinu, baikalinu nebo negleteinu v závislosti na různém pH a při výrazném zvětšení koncentračního poměru měl i diosmin velice významnou redukční schopnost. Naopak žádnou redukční schopnost neprojevil při pH 4.5 apigenin, chrysin, 5-hydroxyflavon a apigenin-7-glukosid, při pH 5.5 chrysin, 5-hydroxyflavon a apigenin-7-glukosid, při pH 6.8 mosloflavon, apigenin, chrysin, 5-hydroxyflavon, apigenin-7-glukosid a při pH 7.5 mosloflavon, chrysin, 5-hydroxyflavon.

Shrnutím poznatků o vlivu struktury na redukční aktivitu testovaných flavonů jsem dospěla k závěru, že redukční aktivita závisí na počtu a lokalizaci hydroxylových skupin.

## 8. Seznam použitých zkratk

BCS	Disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny
COX	Cyklooxygenáza
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
GSH	Glutathion
HA	Hydroxylamin hydrochlorid
n.s.	Nesignifikantní, statisticky nevýznamné
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SOD	Superoxiddismutáza
XO	Xantinoxidáza

## 9. Použitá literatura

1. Adouvani I, Du M, Hang TJ. Identification and Determination of Related Substances in Diosmin Bulk Drug and Pharmaceutical Formulations by HPLC and HPLC-MS. *Chromatographia* 2013;76:499-508.
2. Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 2002;18(1):75-81.
3. Andersen ØM, Markham KR. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. USA: CRC Press, 2006. ISBN 0-8493-2021-6.
4. Balamurugan K, Karthikeyan J. Evaluation of Luteolin in the Prevention of *N*-nitrosodiethylamine-induced Hepatocellular Carcinoma Using Animal Model System. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2012;27:157-163.
5. Banerjee P, Sahoo A, Anand S, Ganguly A, Righi G, Bovicelli P, Saso L, Chakrabarti S. Multiple Mechanisms of Iron-Induced Amyloid Beta-Peptide Accumulation in SHSY5Y Cells: Protective Action of Negletein. *NeuroMolecular Medicine* 2014;16:787-798.
6. Barceloux DG. Copper. *Clinical Toxicology* 1999;37(2):217-230.
7. Bertinato J, L'Abbé MR. Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2004;15:316-322.
8. Brown E, Hurd NS, McCall S, Ceremuga TE. Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin, a *Passiflora incarnata* extract, in the laboratory rat. *American Nephrology Nurses' Association* 2007;75(5):333-337.
9. Daiber A, Mader M, Stamm P, Zinßius E, Kröller-Schön S, Oelze M, Münzel T. Oxidative Stress and Vascular Function. *Cell Membranes and Free Radical Research* 2013;5:221-229.
10. Ding X, Xie H, Kang YJ. The significance of copper chelators in clinical and experimental application. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2011;22:301-310.
11. Fischer AEO, Naughton DP. Metal ion chelating peptides with superoxide dismutase activity. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2005;59:158-162.
12. Gurung RB, Kim EH, Oh TJ, Sohng JK. Enzymatic Synthesis of Apigenin Glucosides by Glucosyltransferase (YjiC) from *Bacillus licheniformis* DSM 13. *Molecules and Cells* 2013;36:355-361.
13. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002;13:572-584.
14. Holeček V. Oxidační stres u nádorových onemocnění. *Klinická biochemie a metabolismus* 2010;4:225-229.

15. Hu CH, Kitts DD. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004;265:107-113.
16. Chen Z, Ying X, Meng S, Zhu X, Jiang H, Cao Q, Li X, Meng F. High-performance Liquid Chromatographic Determination and Pharmacokinetic Study of Apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucoside in Rat Plasma after Intravenous Administration. *Archives of Pharmacal Research* 2011;34:741-746.
17. Chen ZY, SU YL, Bi YR, Tsang SY, Huang Y. Effect of baicalein and acetone extract of *Scutellaria baicalensis* on canola oil oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2000;77:73-78.
18. Ivashev MN, Andreeva OA, Bandyukova VA, Dragaleva TD. Isolation of diosmin from plants of the genus *Vicia* and *Hyssopus officinalis* and its influence on blood coagulation. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 1995;29:707-709.
19. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011;283:65-87.
20. Kiem PV, Minh CV, Huong HT, Lee JJ, Lee IS, Kim YH. Phenolic Constituents with Inhibitory Activity against NFAT Transcription from *Desmos chinensis*. *Archives of Pharmacal Research* 2005;28: 1345-1349.
21. Kumar VP, Das DG. A double blind clinical trial of diosmin (Venex) a bioflavonoid in acute allergic rhinitis. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery* 1995;47:51-53.
22. Li JF, Wang LS, Bai HQ, Yang B, Chen ZG. Synthesis and structure characterization of novel luteolin derivatives. *Chemistry of Natural Compounds* 2010;46:716-718.
23. Lombardo E, Sabellico C, Hájek J, Staňková V, Filipický T, Balducci V, De Vito P, Leone S, Bavavea EI, Silvestri IP, Righi G, Luly P, Saso L, Bovicelli P, Pedersen JZ, Incerpi S. Protection of Cells against Oxidative Stress by Nanomolar Levels of Hydroxyflavones Indicates a New Type of Intracellular Antioxidant Mechanism. *PLoS ONE* 2013;8(4):1-12.
24. Macáková K, Mladěnka P, Filipický T, Říha M, Jahodář L, Trejtnar F, Bovicelli P, Silvestri IP, Hrdina R, Saso L. Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chemistry* 2012;135:2584-2592.
25. Manach C, Morand C, Demigné C, Texier O, Régéat F, Rémésy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *Federation of European Biochemical Societies* 1997;409:12-16.
26. Masopust J, Průša R. *Patobiochemie metabolických drah*. 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 1999. ISBN 80-238-4589-6.
27. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florêncio MH, Jennings KR. Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity. *Free Radical Research* 2002;36(11):1199-1208.

28. Mladěnka P, Macáková K, Filipický T, Zatloukalová L, Jahodář L, Bovicelli P, Proietti Silvestri I, Hrdina R, Saso L. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2011;105:693-701.
29. Mladěnka P, Zatloukalová L, Filipický T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine* 2010;49:963-975.
30. Pełkal A, Biesaga M, Pyrzynska K. Interaction of quercetin with copper ions: complexation, oxidation and reactivity towards radicals. *Biometals* 2011;24:41-49.
31. Pekić B, Zeković Z, Lepojević Ž. Investigation of apigenin-7-O-β- glucoside hydrolysis by β-glucosidase from almonds. *Biotechnology Letters* 1994;16:229-234.
32. Perez CA, Wei Y, Guo M. Iron-binding and anti-Fenton properties of baicalein and baicalin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2009;103:326-332.
33. Perron NR, Brumaghim JL. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2009;53:75-100.
34. Rao SP. Occurrence of luteolin in the flowers of *Chrysanthemum indicum*. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences* 1942;15:123-127.
35. Righi, G, Antonioletti R, Silvestri IP, D'Antona N, Lambusta D, Bovicelli P. Convergent synthesis of mosloflavone, negletein and baicalein from crysin. *Tetrahedron* 2010;66:1294-1298.
36. Říha M, Karlíčková J, Filipický T, Macáková K, Rocha L, Bovicelli P, Silvestri IP, Saso L, Jahodář L, Hrdina R, Mladěnka P. In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *The Royal Society of Chemistry* 2014;4:32628-32638.
37. Shukla S, Gupta S. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. *Pharmaceutical Research* 2010;27:962-978.
38. Silva MM, Santos MR, Caroço G, Rocha R, Justino G, Mira L. Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids: A Re-examination. *Free Radical Research* 2002;36(11):1219-1227.
39. Singh B, Sidiq T, Joshi P, Jain SK, Lawaniya Y, Kichlu S, Khajuria A, Vishwakarma RA, Bharate SB. Anti-inflammatory and immunomodulatory flavones from *Actinocarya tibetica* Benth. *Natural Product Research* 2013;27(23):2227-2230.
40. Singh M, Kaur M, Silakari O. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014;84:206-239.
41. Steglich W, Fugmann B, Lang-Fugmann S. *Römpp encyclopedia natural products*. New York: Thieme, 2000. ISBN 0-86577-988-0.

42. Sugihary N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with  $\alpha$ -linolenic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 1999;27:1313-1323.
43. Štípek S a kolektiv. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, spol. s r.o., 2000. ISBN 80-7169-704-4.
44. Uivarosi V, Badea M, Olar R, Drăghici C, Bărbuceanu SF. Synthesis and Characterization of Some New Complexes of Magnesium (II) and Zinc (II) with the Natural Flavonoid Primuletin. *Molecules* 2013;18:7631-7645.
45. Walle T, Otake Y, Brubaker JA, Walle UK, Halushka PV. Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2001;51:143-146.
46. Wijmenga C, Klomp LWJ. Molecular regulation of copper excretion in the liver. *Proceeding of the Nutrition Society* 2004;63:31-39.
47. Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomás-Barberán FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* 2004;59:113-122.
48. Zhang L, Xu L, Tan XJ, Liao QF, Guo W, Chen XH, Bi KS. Simultaneous Determination of Baicalin, Baicalein, Wogonin, Oxysophocarpine, Oxymatrine and Matrine in the Chinese Herbal Preparation of Sanwu-Huangqin-Tang by Ion-Paired HPLC. *Chromatographia* 2007;66:115-120.



## **10. Abstrakt**

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmaceutické botaniky a ekologie**

**Kandidát:** Mgr. Markéta Jeřábková

**Konzultant:** PharmDr. Jana Karličková, Ph.D.

**Název rigorózní práce:** Měď redukující účinky flavonů

Volné radikály jsou přítomny běžně v našem organismu, ale při jejich nahromadění můžou být příčinou vzniku mnoha onemocnění. Měď je důležitý stopový prvek nezbytný pro mnoho biologických pochodů, ale na druhé straně měď může katalyzovat reakce, při níž vznikají škodlivé radikály.

Flavonoidy jsou rostlinné polyfenoly s mnoha biologickými účinky. Nejvýznamějším účinkem je antioxidační aktivita, která nás chrání před volnými radikály. Flavonoidy také mohou mít i prooxidační účinek.

Tato rigorózní práce byla zaměřena na zjištění redukční aktivity u flavonů (mosloflavon, luteolin, apigenin, chrysin, diosmin, 5-hydroxyflavon, baikalín, baikalein, negletein, apigenin-7-glukosid) při různých pH. Redukční aktivita u hodnocených flavonů byla zjišťována metodikou spektrofotometrické analýzy s využitím selektivního indikátoru měďných iontů v podobě disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny při různých pH. Redukční aktivita závisí na struktuře flavonu a pH prostředí. Z vymezení vztahu mezi strukturou flavonu a redukčním potenciálem vyplývá vliv hydroxylových skupin zejména jejich počet a lokalizace. Vyšší redukční aktivitu projevil luteolin, baikalín nebo negletein a při vyšším koncentračním poměru i diosmin.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** Flavony, Redukční aktivita, Měď, Antioxidanty

## **11. Abstract**

**Charles University in Prague**

**Faculty of Pharmacy in Hradci Králové**

**Department of Pharmaceutical botanic and ecology**

**Candidate:** Mgr. Markéta Jeřábková

**Consultant:** PharmDr. Jana Karličková, Ph.D.

**Title of Thesis:** Copper reducing effects of flavones

Free radicals are commonly present in our organism, however, in case of their accumulation it could cause many diseases. Copper is an important trace element which is essential for many biological processes. On the other hand, copper can catalyze processes which produce damaging radicals.

Flavonoids are polyphenolic compounds with many biological effects. The most important is antioxidant activity which protects us from free radicals. Flavonids can also have a prooxidant effect.

This thesis was focused on a detection of the reducing activity of flavones (mosloflavone, luteolin, apigenin, crysin, diosmin, 5-hydroxyflavone, baicalin, baicalein, negletein, apigenin-7-glucoside) at different pH. A reducing activity of surveyed flavones was taken by the methodics of spectrophotometric analysis with the use of a selective indicator of cuprous ions formed in bathocuproinedisulfonic acid disodium salt at different pH. A reducing activity depends on the structure of flavones and pH environment. From the definition of the relation between the structure of a flavone and a reducing potential arises the influence of hydroxyl groups, particularly their quantity and localization. Luteolin, baicalein, or negletein showed a higher reducing activity. At a higher concentrating relation diosmin showed a higher reducing activity.

**KEYWORDS:** Flavones, Reducing activity, Copper, Antioxidants