

ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA NĚKTERÝCH VOLNĚ PRODEJNÝCH ROSTLINNÝCH EXTRAKTŮ

MUSELÍK J., HYTYCH P.¹, ŽEMLIČKA M.¹

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav technologie léků
¹Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav chemických léčiv

SOUHRN

Antioxidační aktivita některých volně prodejných rostlinných extraktů

V posledních letech znovu vzrůstá zájem veřejnosti při léčbě a prevenci nemocí o tradiční přírodní léčiva jako např. o rostlinné extrakty. Tato práce hodnotí antioxidační aktivitu a obsah fenolických látek vybraných rostlinných extraktů z léčivých rostlin, prodávaných jako potravinové doplňky s léčebným účinkem. Za použití tvorby 3-nitrotyrosinu jako markeru byl studován vliv extraktů na inhibici peroxynitritem indukované nitrace tyrosinu a výsledky byly porovnány se schopností zhaset stabilní radikál 2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Byla zjištěna lineární korelace ($r=0,929$) mezi schopností zhaset DPPH a inhibovat nitrací tyrosinu. Zjištěná antioxidační aktivita byla v rozmezí hodnot 0–1702, resp. 0–1482 μmol ekvivalentu katechinu/100 ml extraktu. Celkový obsah fenolických látek byl v rozmezí hodnot 9,4–268,3 mg ekvivalentu kyseliny galové/100 ml extraktu. Signifikantní lineární vztah mezi antioxidačními aktivitami ($r>0,9$) a celkovým obsahem fenolických látek ukazuje, že fenolické látky jsou hlavní skupinou zodpovědnou za antioxidační aktivitu testovaných extraktů.

Klíčová slova: peroxynitrit – 3-nitrotyrosin – DPPH – antioxidanty – *Ginkgo biloba*

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 114–117

SUMMARY

Antioxidative Activity of Some Over-the-Counter Plant Extracts

The recent years again saw increased interest of the public in the use of traditional natural remedies, such as plant extracts, for the treatment and prevention of diseases. This paper evaluates the antioxidative activity and content of phenolic substances of selected plant extracts from medicinal herbs, sold as dietary supplements with therapeutic effects. Using the production of 3-nitrotyrosine as the marker, the effects of extracts on the inhibition of peroxynitrite-induced nitration of tyrosine was examined, and the results were compared with the ability to extinguish the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). A linear correlation ($r = 0.929$) was found between the ability to extinguish DPPH and to inhibit tyrosine nitration. The found antioxidative activity ranged between values of 0-1702, or 0-1482 μmol of the catechine equivalent/100 ml of the extract. The total content of phenolic substances oscillated within values of 9.4–268.3 mg of the equivalent of gallic acid/100 ml of the extract. The significant linear relationship between antioxidative activities ($r>0.9$) and the total content of phenolic substances shows that phenolic substances are the principal group responsible for the antioxidative activity of the extracts tested.

Key words: peroxynitrite – 3-nitrotyrosine – DPPH – antioxidants – *Ginkgo biloba*

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 114–117

Má

Úvod

Reaktivní formy dusíku a kyslíku (RNS, ROS) jsou v posledních letech intenzivně zkoumány s ohledem na jejich nezanedbatelný fyziologický a patologický význam, spojený s oxidačním stresem. Antioxidanty schopné neutralizovat přebytek ROS a RNS hrají důležitou roli v prevenci řady onemocnění jako např. ateroskleróza, kardiovaskulární a neurologická poškození

nebo karcinogenese^{1, 2}). Peroxynitrit tvořený ze superoxidu a oxidu dusnatého působí jako velmi reaktivní oxidant a jeho marker 3-nitrotyrosin byl detekován ve tkáních pacientů s mnoha onemocněními, jako jsou zánětlivé procesy nebo neurodegenerativní poškození³). V celé řadě prací^{4–7}) byla prokázána antiperoxy-nitritová aktivita látek obsažených v přírodních produktech. Rostliny (ovoce, zelenina, léčivé byliny) mohou obsahovat široké spektrum látek s antioxidačními účin-

ky, jako jsou fenolické látky (např. fenolické kyseliny, flavonoidy, chinony, kumariny, stilbeny, taniny), dusíkaté látky (alkaloidy, aminy), vitaminy, terpenoidy a některé další endogenní metabolity⁸⁾. Polyfenoly, zejména flavonoidy vykazují antikancerogenní, imunostimulační, antialergické, protizánětlivé a antibakteriální účinky⁹⁾ a tvoří tak velmi důležitou skupinu látek hojně rozšířenou v rostlinném materiálu. Zájem identifikovat antioxidanty s potenciálně terapeutickým a preventivním působením při vzniku a rozvoji onemocnění, spojených s oxidačním stresem, je značný.

Důležitou součástí studia antioxidační aktivity je výběr a použití robustní a rychlé metody, zejména při studiu velkého počtu vzorků. Tyto metody zahrnují různé mechanismy stanovení antioxidační aktivity. Běžně používané jsou metody založené na spektrofotometrickém stanovení úbytku stabilních radikálů jako ABTS⁺ [2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonát) kation radikál]¹⁰⁾ nebo DPPH [2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl]¹¹⁾. Chemické metody pro studium antioxidační aktivity často využívají možnosti stanovení stabilních produktů, vzniklých reakcí vhodné cílové molekuly s ROS nebo RNS jako např. peroxy-nitrit¹²⁾, hydroxylový radikál, superoxid¹³⁾ atd. Jinou skupinu tvoří metody pro stanovení celkové antioxidační schopnosti jako FRAP (ferric reducing/antioxidant power)¹⁴⁾ nebo stanovení antioxidační aktivity za využití elektrochemické generace bromu¹⁵⁾. Všechny tyto uvedené metody mohou být využity při studiu antioxidační aktivity extraktů z léčivých rostlin.

V této práci je demonstrováno studium antioxidační aktivity rostlinných extraktů (potravinových doplňků) při použití dvou experimentálních metod (inhibice nitrace tyrosinu a redukce DPPH). Vztah mezi těmito použitými metodami je vyjádřen pomocí regresní analýzy a statisticky je také zhodnocen vztah mezi celkovým obsahem fenolů a antioxidační aktivitou. Skříninkové studium antioxidační aktivity rostlinných extraktů je potenciálním zdrojem dalších účinných zláštěčů volných radikálů nebo jiných reaktivních forem kyslíku a dusíku.

POKUSNÁ ČÁST

Chemikálie a roztoky

Tyrosin (BDH Chemicals), 3-nitrotyrosin (Aldrich), DPPH (Sigma), (+)-katechin a kyselina galová (Fluka), standardizovaný extrakt *Ginkgo biloba* (Furfural L02 D001), standardizovaný extrakt *Ginkgo biloba* (Biomedica S 721035), volně prodejné rostlinné extrakty *Alchemilla vulgaris*, *Calendula officinalis*, *Epilobium parviflorum*, *Filipendula ulmaria*, *Galium verum*, *Ginkgo biloba*, *Hippophae rhamnoides*, *Hypericum perforatum*, *Silybum marianum*, *Solidago virgaurea*, *Tropaeolum majus*, *Verbascum densiflorum* (Herba Vitalis, s.r.o.), volně prodejný extrakt *Ginkgo biloba* (AROMATICA, v.o.s.). Všechny ostatní použité chemikálie byly komerčně dostupné a byly p.a. čistoty.

Roztok peroxy-nitritu byl připraven podle metody popsané

v literatuře¹⁶⁾. 10 ml 0,6 M H₂O₂ (v 0,5 M HClO₄) a 10 ml 0,5 M NaNO₂ (ve vodě) byly ochlazeny na teplotu -2 °C a poté rychle smíchány. Reakce byla ihned zastavena přidávkou 5 ml 3,5 M NaOH. Zbytkový H₂O₂ byl odstraněn mícháním suspenze s MnO₂ (1 mg/ml) po dobu 10 minut. Nezareagovaný MnO₂ byl odstraněn filtrací. Koncentrace ONOO⁻ v alkalickém roztoku byla stanovena spektrofotometricky ($\epsilon_{302} = 1,67 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Zásobní roztok byl uchovávan při teplotě -80 °C po dobu několika měsíců bez zdatelného rozkladu.

Roztoky standardizovaných extraktů *Ginkgo biloba* byly připraveny rozpuštěním standardizovaného extraktu v 60% ethanolu (v/v) a poté naředěním vodou v poměru 2:1 (v/v) na výslednou koncentraci 8 mg/ml.

Zkoumadlo fosfomolybdenan-wolframové R bylo připraveno podle ČL 2002.

Přístroje

Kapalinový chromatograf HP 1100 (Agilent Technologies) obsahoval kvaternární pumpu, autosampler a detektor s diodovým polem. Analýzy byly prováděny na koloně Supelcosil ABZ+Plus (250.4,6 mm, 5 μm) s mobilní fází 90 % 40 mM HCOOH : 10 % CH₃CN v/v, isokraticky při průtoku 1 ml/min).

Pro měření absorpčních spekter byl použit spektrofotometr HP 8453 (Hewlett Packard), při přípravě roztoků digitální pH metr inoLab pH Level 2 (WTW).

Antioxidační aktivita

Měření inhibice nitrace tyrosinu bylo prováděno následujícím způsobem: roztok 2 mM peroxy-nitritu (8 μl) v 0,05 M NaOH byl nabrán a smíchán v injektoru HPLC s 1 mM roztokem tyrosinu a 200x naředěným rostlinným extraktem (standardizovaným extraktem *Ginkgo biloba*) v 0,11 M fosfátovém pufru (42 μl). Reakční směs byla injektována přímo na kolonu HPLC, chromatogramy byly detegovány při 276 nm. Inhibice nitrace tyrosinu byla vypočítána relativně ke zjištěné ploše piku 3-nitrotyrosinu v kontrolním měření a zjištěná aktivita byla porovnána s kalibrační křivkou pro katechin. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent antioxidační aktivity katechinu v μmol na 100 ml extraktu.

Schopnost zláššet radikály byla sledována pomocí stabilního radikálu DPPH. Roztok (25 μl) rostlinného extraktu nebo standardizovaného extraktu *Ginkgo biloba* naředěný methanolem 1:10 (v/v) byl doplněn do 2,0 ml 0,1 mM DPPH v methanolu a po 5 minutách byla změřena absorbance při 517 nm. Redukce DPPH byla vypočítána relativně k hodnotě absorbance v kontrolním měření a zjištěná aktivita byla porovnána s kalibrační křivkou pro katechin. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent antioxidační aktivity katechinu v μmol na 100 ml extraktu.

Celkové fenoly

Celkový obsah fenolů byl odhadnut pomocí kolorimetrické metody popsané v literatuře⁸⁾. 700 μl vodou naředěného rostlinného extraktu nebo roztoku standardizovaného extraktu *Ginkgo biloba* (ředěno v poměru 1:10 až 1:100, v/v) bylo oxidováno zkoumadlem fosfomolybdenan-wolframovým R (400 μl) a potom byla reakční směs doplněna do 10,0 ml roztokem uhlíčitánu sodného (75 g/l). Po 2 hodinách byla změřena výsledná absorbance při 760 nm. Kvantifikace byla provedena na základě kalibrační křivky pro kyselinu galovou. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny galové (GAE) v mg na 100 ml extraktu.

Statistická analýza

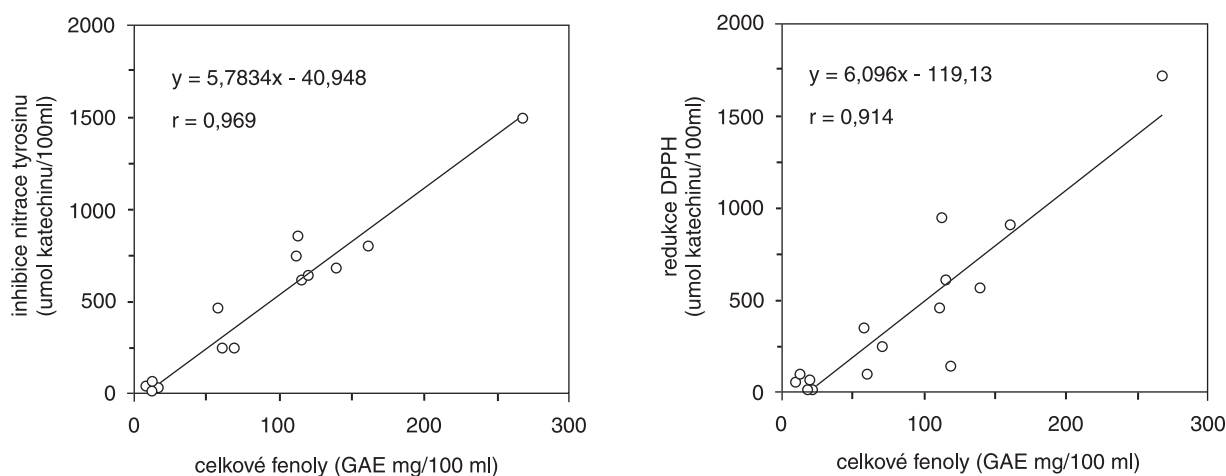
Výsledky byly zpracovány použitím jednofaktorové analýzy (ANOVA). Rozdíly při $p < 0,05$ byly považovány za signifikantní. Dále byla provedena jednoduchá regresní analýza pro vyjádření vztahu mezi použitými metodami.

Tab. 1. Antioxidační aktivita a celkový obsah fenolů testovaných rostlinných extraktů
Data jsou uváděna ± směrodatná odchylka ze tří měření.

Extrakt	zdroj	celkový obsah fenolů (GAE mg/100 ml) ^a	redukce DPPH (μmol katechinu/100 ml) ^b	inhibice nitrace tyrosinu (μmol katechinu/100 ml) ^b	hlavní skupiny obsahových látek u rostlin použitých k přípravě extraktů ^{20–23)}
<i>Alchemilla vulgaris</i>	Herba Vitalis	58,0±0,3	338±19	462±21	třísloviny, hořčiny, silice, kyselina salicylová
<i>Calendula officinalis</i>	Herba Vitalis	21,6±0,9	0±12	27±17	silice, hořčiny, flavonoidy, glykosidy, karotenoidy, kyselina salicylová
<i>Epilobium parviflorum</i>	Herba Vitalis	115,8±4,5	594±21	608±50	flavonolové glykosidy
<i>Filipendula ulmaria</i>	Herba Vitalis	268,3±1,2	1702±46	1482±56	flavonoidy, silice, deriváty kyseliny salicylové, třísloviny
<i>Galium verum</i>	Herba Vitalis	69,9±3,9	242±13	247±14	glykosidy, silice, třísloviny, organické kyseliny
<i>Ginkgo biloba</i>	AROMATICA	60,7±0,4	86±21	250±28	ginkgolidy, flavon luteolin, flavonoidy a jejich glykosidy, biflavony, fenolické kyseliny
<i>Ginkgo biloba</i>	Biomedica	192,7±6,2	936±23	849±44	
<i>Ginkgo biloba</i>	Furfural	161,2±9,2	899±27	795±31	
<i>Ginkgo biloba</i>	Herba Vitalis	9,4±0,5	49±15	39±12	
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Herba Vitalis	12,8±0,6	89±24	62±20	glykosid kvercetin, organické kyseliny, vitaminy A,C,E
<i>Hypericum perforatum</i>	Herba Vitalis	139,1±6,8	560±18	689±19	hypericiny, katechinové třísloviny, flavonové glykosidy, silice
<i>Silybum marianum</i>	Herba Vitalis	119,4±1,3	124±19	635±54	silymarin, olej s vysokým obsahem kyseliny linolové a olejové, tokoferol
<i>Solidago virgaurea</i>	Herba Vitalis	111,1±0,8	454±20	747±76	flavonoidy, třísloviny, saponiny, silice
<i>Tropaeolum majus</i>	Herba Vitalis	18,0±0,9	0±10	0±24	glykosid glukotropeolin
<i>Verbascum densiflorum</i>	Herba Vitalis	20,1±1,1	52±4	0±13	kyselá a neutrální saponiny, flavonoidy, iridoidy, karotenoidy, slizy, silice

^a Data jsou vyjádřena v mg ekvivalentu kyseliny galové na 100 ml extraktu.

^b Data jsou vyjádřena v mikromolech ekvivalentu katechinu na 100 ml extraktu.



Obr. 1. Vztah mezi antioxidační aktivitou a celkovým obsahem fenolů v extraktech

VÝSLEDKY A DISKUZE

Použitými metodami byla otestována schopnost extraktů léčivých rostlin zhaset radikály a reaktivní formy kyslíku a dusíku. Použité metody jsou nejen rychlé a spolehlivé, ale v případě inhibice nitrace tyrosinu bylo měření automatizováno s využitím autosampleru HPLC a jednotlivé analýzy probíhaly podle předem nastavené sekvence operací.

Byla proměřena antioxidační aktivita a celkový obsah fenolů řady volně prodejných ethanolických extraktů z léčivých rostlin od firmy Herba Vitalis a extraktu *Ginkgo biloba* od firmy AROMATICA. Dále byly studovány standardizované extrakty *Ginkgo biloba*. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 1. Zjištěná antioxidační aktivita byla v rozmezí hodnot 0–1702 (redukce DPPH), resp. 0–1482 (inhibice nitrace tyrosinu) μmol ekvivalentu katechinu/100 ml extraktu. Celkový obsah fenolických látek byl v rozmezí hodnot 9,4–268,3 mg ekvivalentu kyseliny galové/100 ml

extraktu. Ze studovaných potravinových doplňků dosahoval ve všech experimentech nejvyšších hodnot extrakt z *Filipendula ulmaria* (Herba Vitalis). Antiperoxynitritová aktivita dále klesala v pořadí: *Solidago virgaurea* (Herba Vitalis) > *Hypericum perforatum* (Herba Vitalis) > *Silybum marianum* (Herba Vitalis) > *Epilobium parviflorum* (Herba Vitalis) > *Alchemilla vulgaris* (Herba Vitalis) > *Ginkgo biloba* (AROMATICA) \approx *Galium verum* (Herba Vitalis). Rozdíly mezi extrakty *Solidago virgaurea*, *Hypericum perforatum*, *Silybum marianum* a *Epilobium parviflorum* nejsou statisticky signifikantní. Pořadí aktivit extraktů při redukci DPPH bylo následující: *Filipendula ulmaria* (Herba Vitalis) > *Epilobium parviflorum* (Herba Vitalis) > *Hypericum perforatum* (Herba Vitalis) > *Solidago virgaurea* (Herba Vitalis) > *Alchemilla vulgaris* (Herba Vitalis) > *Galium verum* (Herba Vitalis) > *Silybum marianum* (Herba Vitalis). Rozdíly mezi extrakty *Epilobium parviflorum* a *Hypericum perforatum* nejsou statisticky signifikantní. Extrakty *Hippophae rhamnoides* (Herba Vitalis), *Calendula officinalis* (Herba Vitalis), *Verbascum densiflorum* (Herba Vitalis), *Tropaeolum majus* (Herba Vitalis) a *Ginkgo biloba* (Herba Vitalis) vykázaly ve všech testech jen velmi malou nebo žádnou aktivitu (< 100 μ mol ekvivalentu katechinu na 100 ml extraktu). Extrakt *Ginkgo biloba* (AROMATICA) vykazoval velmi malou aktivitu jen v experimentu s DPPH (tab. 1).

Z porovnání hodnot antioxidační aktivity zjištěných různými metodami vyplývá, že míra antioxidačního působení může záviset na použité metodě. To pravděpodobně souvisí s mechanismem, který daná metoda využívá pro studium antioxidační aktivity. Pro všechny studované rostlinné extrakty byla provedena regresní analýza mezi výsledky inhibice nitrace tyrosinu, redukce DPPH a celkovým obsahem fenolů. Zjištěný korelační koeficient ukazuje na signifikantní lineární závislost mezi schopností inhibovat nitraci tyrosinu a redukovat DPPH ($r=0,929$). Signifikantní lineární vztah mezi antioxidačními aktivitami ($r>0,9$) a celkovým obsahem fenolů (obr. 1) ukazuje, že fenolické látky byly hlavní skupinou zodpovědnou za antioxidační aktivitu testovaných extraktů.

Potravinové doplňky z *Ginkgo biloba*, který je v literatuře uváděn jako vynikající zhášec radikálů^{17, 18}, vykazovaly jen malou antioxidační aktivitu, a proto byly tyto výsledky porovnány s antioxidační aktivitou standardizovaných extraktů *Ginkgo biloba* od firmy Furfural a od firmy Biomedica. Roztoky standardů vykazovaly výraznou antioxidační aktivitu v porovnání s potravinovými doplňky *Ginkgo biloba* (tab. 1). Tento rozpor je možné vysvětlit různým obsahem celkových fenolů v extraktech *Ginkgo biloba* prodáváných jako potravinové doplňky a ve standardizovaných extraktech (tab. 1). Důvodem velmi nízké antioxidační aktivity extraktu *Ginkgo biloba* (Herba Vitalis) je zřejmě výrobcem nevhodně zvolený postup přípravy extraktů, nezaručující

dostatečný obsah účinných látek. Vysvětlení je možno najít na www stránkách firmy Herba Vitalis¹⁹, kde výrobce uvádí, že při přípravě extraktů používá neporušené listy.

Práce je součástí výzkumného záměru podporovaného v rámci grantu MSM 163700003.

LITERATURA

1. **Hercberg, S., Galan, P., Preziosi, P. et al.:** Nutrition, 1998; 14, 513.
2. **Johnson, P.:** Comp. Biochem. Physiol., 2002; 133C, 493.
3. **Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N. et al.:** Free Radic. Biol. Med., 2001; 30, 463.
4. **Paquay, J. B. G., Haenen, G. R. M. M., Korthouwer, R. E. M., Bast, A.:** J. Agric. Food Chem., 1997; 45, 3357.
5. **Niwa, T., Doi, U., Kato, Y., Osawa, T.:** FEBS Lett., 1999; 459, 43.
6. **Ketsawatsakul, U., Whiteman, M., Halliwell, B.:** Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000; 279, 692.
7. **Chung, H. Y., Yokozawa, T., Soung, D. Y. et al.:** J. Agric. Food Chem., 1998; 46, 4484.
8. **Caia, Y., Luob, Q., Sunc, M., Corkea, H.:** Life Sci., 2004; 74, 2157.
9. **Cook, N. C., Samman, S.:** Nutr. Biochem., 1996; 7, 66.
10. **van den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., van den Berg, H. et al.:** Food Chem., 2000; 70, 391.
11. **Sroka, Z., Cisowski, W.:** Food Chem. Tox., 2003; 41, 753.
12. **Heijnen, C. G. M., Haenen, G. R. M. M., van Acker, F. A. A. et al.:** Toxicol. Vitro, 2001; 15, 3.
13. **Yao, D., Vlessidis, A. G., Evmiridis, N. P. et al.:** Anal. Chim. Acta., 2002; 467, 145.
14. **Benzie, I. F. F., Strain, J. J.:** Anal. Biochem., 1996; 239, 70.
15. **Abdullin, I. F., Turova, E. N., Budnikov, G. K.:** J. Anal. Chem., 2001; 56, 557.
16. **Lymar, S. V., Jiang, Q., Hurst, J. K.:** Biochemistry, 1996; 35, 7855.
17. **Bridi, R., Crossetti, F. P., Steffen, V. M., Henriques, A. T.:** Phytother. Res., 2001; 15, 449.
18. **Scholtyssek, H., Damerau, W., Wessel, R., Schimke, I.:** Chem. Biol. Interact., 1997; 106, 183.
19. Rozhovor s ing. Pavlem Pokorným [on-line]. Herba Vitalis, [cit. 2004-05-28]. URL: <http://www.herbavitalis.cz/texty.html#priprava>.
20. **Tomko, J. et al.:** Farmakognózia. 2. vyd., Martin, Osveťa, 1999.
21. **Volák, J. et al.:** Velká kniha léčivých ratlín. Praha, Artia, 1987.
22. **Slacanin, I., Marston, A., Hostettmann, K. et al.:** J. Chrom. A, 1991; 557, 391.
23. **Teris van Beek, A.:** J. Chrom. A, 2002; 967, 21.

Došlo 2. 6. 2004.

Přijato ke zveřejnění 30. 9. 2004.

Mgr. Jan Muselik
Palackého 1-3, 612 42 Brno
e-mail: muselikj@vfu.cz