

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Analýza vybraných fenolických látek v ostropestřci
mariánském (*Silybum marianum*)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Zuzana Baťková

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.

Olomouc 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 4. května 2022

.....

Podpis

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu této práce panu doc. RNDr. Davidu Jirovskému, Ph.D. za jeho ochotu, odborný dohled i vstřícný přístup. Dále děkuji panu Mgr. Janu Rozsypalovi za spolupráci a pomoc při měření.

V neposlední řadě děkuji i své rodině a příteli za jejich podporu.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Zuzana Baťková
Název práce:	Analýza vybraných fenolických látek v ostropestřci mariánském (<i>Silybum marianum</i>)
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta univerzity Palackého v Olomouci, Česká republika
Vedoucí práce:	doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2022

Anotace:

Tato práce je zaměřena na analýzu bioaktivních látek taxifolinu a silibininu, vyskytující se v ostropestřci mariánském. *Silybum marianum* neboli ostropestřec mariánský je známá rostlina, především díky svým pozitivním účinkům na léčbu jaterních onemocnění.

V rámci této bakalářské práce byla studována elektroaktivita standardů taxifolinu a silibininu. Silibinin se vyskytuje jako ekvimolární směs dvou diastereoizomerů A a B. Při vývoji metody bylo dosaženo úplné separace a následné identifikace těchto dvou diastereoizomerů. Cílem práce bylo navrhnout jednoduchou a rychlou metodu pro analýzu taxifolinu a silibininu v reálných vzorcích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s elektrochemickým detektorem. Elektrochemický detektor se ukázal jako vhodný pro selektivní a citlivou detekci elektroaktivních látek obsažených ve dvou reálných vzorcích z ostropestřce. Analýzou bylo zjištěno, že obě tinktury mají podobný profil obsahových látek, ačkoliv při výrobě tinktur byly použity odlišné části rostliny.

Klíčová slova:	Taxifolin, silibinin, bioaktivní látky, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, elektrochemická detekce
Počet stran:	46
Počet příloh:	0
Jazyk:	český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Zuzana Baťková
Title: Analysis of selected phenolics in milk thistle
Type of thesis: Bachelor's
Department: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Czech Republic
Supervisor: doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.
The year of submission: 2022

Annotation:

The presented bachelor thesis is focused on analysis of bioactive compounds in milk thistle. *Silybum marianum* or milk thistle is a well-known plant, mainly due to its positive effects on liver treatment.

This bachelor thesis deals with the electroactivity of standards taxifolin and silibinin. The flavonolignan silibinin occurs in the nature as an equimolar mixture of two diastereoisomers, silibinin A and silibinin B. The aim of this thesis was to develop quick and simple method for the determination of taxifolin and silibinin in real samples using high-performance liquid chromatography (HPLC) in combination with electrochemical detector. The electrochemical detector proved to be suitable for the selective and sensitive detection of electroactive substances contained in alcoholic tinctures. The analysis showed that both tinctures had a similar content profile, although different parts of the plant were used in the production of the tinctures.

Keywords: Taxifolin, silibinin, bioactive compounds, high-performance liquid chromatography, electrochemical detection
Number of pages: 46
Number of appendices: 0
Language: Czech

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Léčivé rostliny	9
2.2	Ostropestřec mariánský	10
2.2.1	Popis	10
2.2.2	Obsahové látky	12
2.2.3	Historie	12
2.2.4	Půdní a klimatické podmínky	13
2.2.5	Sběr	13
2.2.6	Pěstování	13
2.3	Biologicky aktivní látky	15
2.3.1	Polyfenoly	15
2.3.2	Flavonoidy	15
2.3.3	Taxifolin	16
2.3.4	Flavonolignany	17
2.3.5	Silybin (silibinin)	17
2.3.6	Silychristin	18
2.4	Farmakologické účinky	19
2.4.1	Antioxidační účinky	19
2.4.2	Protizánětlivé účinky	19
2.4.3	Hepatoprotektivní účinky	19
2.4.4	Protirakovinné účinky	21
2.4.5	Účinky na laktaci	21
2.4.6	Toxicita a nežádoucí účinky	22
2.5	Doplňky stravy	22
2.5.1	Bezpečnost	22
2.5.2	Kontaminanty v extraktech ostropestřce mariánského	23
2.5.3	Aktuálně dostupné produkty z ostropestřce mariánského v ČR	23
2.6	Současné metody analýzy ostropestřce a jeho produktů	25
3	Cíle práce	26
4	Experimentální část	27

4.1	Instrumentální vybavení.....	27
4.2	Chemikálie	27
4.3	Vzorky.....	28
4.4	Pracovní postup.....	28
4.4.1	Cyklická voltametrie.....	28
4.4.2	Chromatografické podmínky	29
4.4.3	Příprava pufru a mobilní fáze	29
4.4.4	Příprava standardů	29
4.4.5	Příprava směsi dvou standardů k analýze HPLC.....	29
4.4.6	Příprava vzorků k analýze HPLC	30
4.4.7	Příprava vzorku k analýze HPLC metodou spikování.....	30
5	Výsledky a diskuze.....	31
5.1	Studium elektrochemické aktivity standardů taxifolinu a silibininu.....	31
5.2	Analýza směsi standardů taxifolinu a silibininu	33
5.3	Analýza reálných vzorků z ostropestřce mariánského	35
5.4	Ověření přítomnosti bioaktivních látek ve vzorcích metodou přidavku standardu (spikování).....	36
6	Závěr.....	39
7	Seznam použitých zkratk	40
8	Zdroje	41

1 Úvod

Léčivé rostliny jsou již od pradávna ceněny pro obsah biologicky aktivních látek, které mají pozitivní vliv na lidské zdraví. V medicíně mají léčivé rostliny stále své pevné místo a využívají se především jako prevence, ale i při léčbě onemocnění a pro celkovou obnovu organismu. Kromě medicíny se dále využívají v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Díky vzrůstající oblibě zdravého životního stylu se léčivé rostliny dostávají více do podvědomí veřejnosti a stoupá tak zájem o různé léčivé přípravky a doplňky stravy.

Biologicky aktivní látky jsou produkty sekundárního metabolismu nejen rostlin, ale i mikroorganismů, hub a některých živočichů. Jedinečný silymarinový komplex, z něhož neúčinnější složkou je flavonolignan silybin, je produktem sekundárního metabolismu rostliny ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* L. Gaertn.). Tato bodlákovitá rostlina se sytě fialovým květenstvím je již dlouhá léta známá hlavně svým pozitivním účinkem na regeneraci jaterní tkáně. Také působí protizánětlivým a antioxidačním efektem. Další látkou se silným antioxidačním efektem, která je v této práci studována, je flavanon taxifolin.

Ostropestřec mariánský je široce známá a studovaná rostlina, její fytochemické využití se stále rozšiřuje. Předložená bakalářská práce se v teoretické části věnuje nejdůležitějším farmakologickým účinkům ostropestřce mariánského, chemickému složení rostliny, zejména biologicky aktivním látkám, dále botanické charakterizaci rostliny, její historii a agroekologickým požadavkům. Zvláště jsou také zpracovány kapitoly o současných problémech doplňků stravy a přehled výrobků z ostropestřce mariánského na českém trhu.

Cílem této bakalářské práce je studium elektroaktivity standardů taxifolinu a silibininu pomocí cyklické voltametrie. A následně vyvinout a optimalizovat jednoduchou a rychlou HPLC metodu separace a stanovení biologicky aktivních látek taxifolinu a diastereoizomerů silibininu A a B ve dvou reálných vzorcích z ostropestřce mariánského.

2 Teoretická část

2.1 Léčivé rostliny

Mnohé rostliny slouží od nepaměti v lidovém léčitelství jako zdroj přírodních léčivých látek proti různým onemocněním. Léčivé rostliny jsou ty rostliny, které ve své některé části anebo více částech obsahují látky, které mají terapeutické využití nebo slouží jako suroviny pro farmaceutickou výrobu. Rostlinná droga je část léčivé rostliny, která se používá k terapeutickým účelům, tedy léčivá část může být kořen, nať, listy, květy nebo plody [1].

Obsahové nebo specifické látky léčivé rostliny jsou produkty primárního a především sekundárního metabolismu. Nejdůležitější obsahové látky léčivých rostlin jsou silice, alkaloidy, glykosidy, flavonoidy, hořčiny, třísloviny, kumariny a barviva [1]. Rostliny produkují nespočet rozmanitých organických sloučenin, z nichž se většina přímo neúčastní důležitých fyziologických dějů v rostlině, jako je růst, vývoj a rozmnožování. Tyto látky jsou označovány jako sekundární metabolity. Naproti tomu primární metabolity, jako jsou aminokyseliny, nukleotidy, organické kyseliny a fytosteroly, se nachází ve všech rostlinách a jsou nepostradatelné v metabolických procesech rostlin [2].

V dnešní době stále vzrůstá obliba používání léčivých rostlin a jejich přípravků z nich vyrobených. Světová i česká produkce LAKR – léčivých, aromatických a kořeninových rostlin – je určována zájmem o lidské zdraví, ale i požadavkem na kvalitu produktů. Zajištění kvality je právě současným trendem, zavádí se správná pěstitelská praxe včetně posklizňové úpravy a skladování v konvenčním a ekologickém zemědělství. Pěstování LAKR v České republice má pravidelný kolísavý trend. Vrchol pěstování LAKR byl v roce 2011, kdy rozloha LAKR dosáhla 8 588 ha. V posledních letech se podle dostupných dat pěstební plocha LAKR snižuje, v roce 2019 dle Českého statistického úřadu pěstební plochy představovaly rozlohu 6 062 ha. V následujícím roce 2020 pak došlo ke snížení na 5 657 ha, meziroční pokles odpovídá 6,7 %. Nejvýznamnějšími plodinami byly v letech 2019 a 2020 ostropestřec mariánský a kmín kořený [3].

2.2 Ostropestřec mariánský

Botanický název: *Silybum marianum*(L.) Gaertn.

Klasifikace:

Říše	Rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše	Cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení	Krytosemenné rostliny (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída	Vyšší dvouděložné rostliny (<i>Rosopsida</i>)
Řád	Hvězdicotvaré (<i>Asterales</i>)
Čeleď	Hvězdicovité (<i>Astraceae</i>)
Rod	Ostropestřec (<i>Silybum</i>)

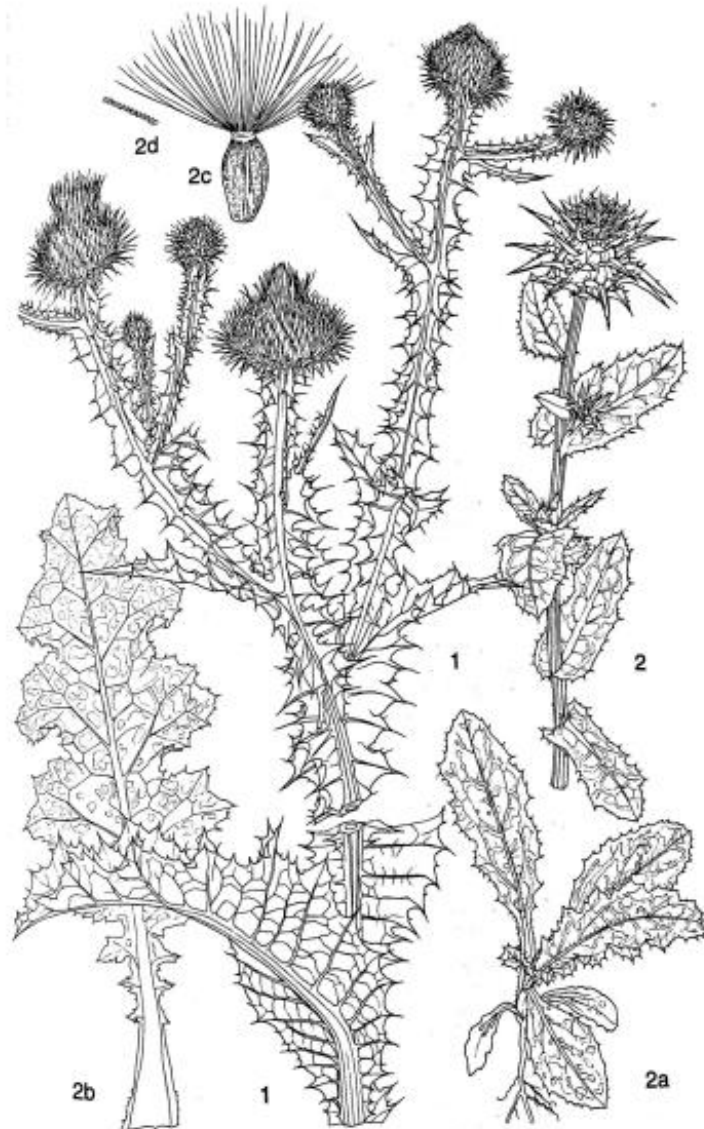


Obrázek 1: Fialový květ ostropestřce mariánského [4]

2.2.1 Popis

Ostropestřec mariánský je statná jednoletá až dvouletá ostnitá bylina. Obecně jsou tyto byliny 60 – 150 cm vysoké, pavučinatě chlupaté a roztroušeně žláznaté. Kořen je kulový. Lodyžní listy jsou střídavé, bíle skvrnité. Přízemní listy jsou v růžici, tvarem i barvou jsou podobné lodyžním listům, povrch listů je lesklý. Úbory jsou jednotlivé, vzpřímené, dlouze stopkaté a široce kuželovité, 3 – 7 cm široké. Květy jsou 3,5 – 4 cm

dlouhé s velmi dlouhou bílou korunní trubkou v horní třetině baňkovitě rozšířenou, červenou až světle fialovou, přecházející ve špičaté cípy stejné barvy. Nažky jsou asymetricky kuželovité, 7 – 8 cm dlouhé a 3,0 – 5,4 cm široké. Nažky jsou dále lesklé, kávově hnědé, s mnoha čárkovitými tmavohnědými skvrnami, chmýr je snadno opadavý [5].



Obrázek 2: Ostropestřec mariánský. Popisky: 1 – ostropes trubil (*Onopordum acanthium*, L.), 2 – ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*, L.), 2a – přízemní listová růžice, 2b – dolní list, 2c – nažka, 2d – detail vnějšího paprsku chmýru [5]

2.2.2 Obsahové látky

Z ostropestřce se využívají nažky a nať. Nažky obsahují 26–28 % bílkovin a 25–35 % jedlého oleje v přibližném složení 55–72 % kyseliny linolové, 25–35 % kyseliny olejové, a 8–14 % nasycených mastných kyselin. Obsah tokoferolu se pohybuje mezi 500–800 mg/kg [5]. Aktivními složkami přítomné v semenech ostropestřce jsou dále apigenin, silybonol a betain [6]. Hlavními nositeli léčivých účinků jsou flavonolignany tzv. silymarinového komplexu. Tyto účinné látky jsou obsaženy v oplodí nažek, zatímco nať jich obsahuje jen zanedbatelné množství a nemá tak význam ve farmaceutickém průmyslu [5].

2.2.3 Historie

Lékařské využití ostropestřce se datuje do dob antických lékařů a svou popularitu si upevňuje dodnes. Již 2. století př. n. l. byl ostropestřec popsán řeckým filozofem Theofrastem, žákem a nástupcem Aristotela, který ostropestřec označoval pod jménem *Pternix*. Římský léčitel Plinius se domníval, že podporuje odtok žluči a řecký botanik a chirurg Dioscorides jej popsal ve své knize *Materia Medica* [8], [9]. V 16. století se ostropestřec stal oblíbeným lékem na onemocnění jater, žluči a žlučových cest, konkrétně jej popsal přední anglický bylinář Nicholas Culpeper knize *The English Physitian*, ve které je zmíněn jako vynikající lék na obstrukci jater a sleziny. Na přelomu minulého století skupina bylinářů, jejíž členové byli nazýváni eklektici, používali extrakty z ostropestřce mariánského k léčbě poruch jater, sleziny, ledvin a menstruace. Lékařský zájem o tuto látku slábl až do 60. let 20. století, kdy výzkumné studie, především v Německu, zaměřily pozornost na ostropestřec mariánský a jeho složky při léčbě akutních a chronických onemocnění jater a jako hepatoprotektivní činidlo k prevenci toxického poškození jater [9].

Dříve byla tato bylina nazývána ostropes nebo bodlák mariánský. Teprve v roce 1879 Čelakovský a Jungmann pozměnili jeho jméno na ostropestřec mariánský. Vycházeli z jeho základních vlastností „ostrý“ a „pestrý“ a usoudili, že jsou výstižným znakem pro jeho jméno [7].

Za původní teritorium ostropestřce se považují Kanárské ostrovy, Středomoří, Malá a Přední Asie. Zavlečený se vyskytuje na mnoha dalších místech všech světadílů. Ve Střední Evropě roste pouze jako zdomácnělý [5].



Obrázek 3: Ostropestřec mariánský na poli [10]

2.2.4 Půdní a klimatické podmínky

Vhodné podmínky pro růst má ostropestřec v řepné, kukuřičné a bramborářské výrobní oblasti od 200 do 600 m. n. m. Nejvhodnější půda je černozem, hnědozem, nivní a lužní půdy. Důležitá je dostatečná vlhkost v první fázi růstu – klíčení – až po začátek kvetení, dále musí být rostliny pěstovány ve slunné, ne však suché oblasti. Ostropestřec je teplomilná a světlomilná rostlina, která citlivě reaguje na velké teplotní výkyvy, vhodná průměrná roční teplota má být alespoň 6–8 °C [11].

2.2.5 Sběr

Dozrávání nažek signalizuje bílý chmýr, který se objevuje v horní části úboru. Vhodný porost ke sběru musí mít 30% dozrávajících, otevřených květních úborů, ostatní úbory by měly usychat. Protože nelze jednoznačně určit správný termín sběru, může sběr probíhat v rozmezí červenec–září [11], [12].

2.2.6 Pěstování

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Databázi odrůd aktuálně čítá osm odrůd ostropestřce: Mirel, Aida, Tevasil, Mirel Plus, Tevadian, Moravia55, Dominicus a Albus [13].

Jak již bylo dříve zmíněno, mezi významné komodity v České republice v rámci pěstovaných LAKR patří ostropestřec mariánský a kmín kořený, dále pěstování námele a máku. Největší podíl na produkci léčivých rostlin zaujímá ostropestřec mariánský, který má zásadní podíl na zvyšování celkových pěstebních ploch léčivých rostlin. Zvyšuje se poptávka ze strany tuzemských i zahraničních zpracovatelů, nejvíce z farmaceutického průmyslu, ale i z potravinářství. Pěstování ostropestřce je realizováno ve většině případů na zakázku od zpracovatele, který dodává pěstiteli i osivo, přičemž jeho kvalita je hlavní podmínkou pro dostatečnou a kvalitní produkci. Ve farmacii se pro izolaci účinných látek využívají pokrutiny po lisování oleje z nažek. Olej vzniká jako vedlejší produkt při zpracování a uplatňuje se v kosmetice, v poslední době také v potravinářství. Rozvíjí se také zpracování nažek ostropestřce v krmivářství [3].

Tabulka 1: Objem produkce ostropestřce mariánského v ČR [3]

Rok	Plocha (ha)	Výnos (t/ha)
2007	1500	0,80
2008	2000	0,75
2009	3500	0,68
2010	-	-
2011	5000	-
2012	5000	0,50
2013	4500	0,60
2014	4700	0,65
2015	5000	0,71
2016	5170	0,68
2017	3500	0,50
2018	3000	0,42
2019	2000*	0,40
2020	-	0,35*

**odhad*



Obrázek 4: Rozšíření ostropestřce mariánského v Evropě (černá) [14]

2.3 Biologicky aktivní látky

2.3.1 Polyfenoly

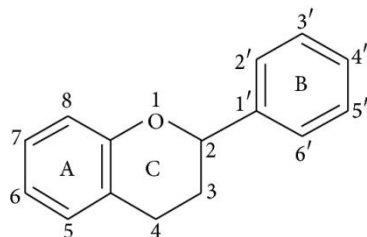
Polyfenoly jsou sekundárními metabolity rostlin. Jejich chemické složení se pohybuje od jednoduchých fenolových kyselin až po vysokomolekulární sloučeniny. Více než 8000 fenolických a polyfenolických sloučenin bylo rozpoznáno v různých rostlinných druzích, kde mají několik důležitých funkcí, mezi něž se řadí: ochrana před UV zářením, inhibice vývoje patogenů, rozklad mikroorganismů, ochrana před reaktivními formami kyslíku. V závislosti na počtu fenolových kruhů a vzájemném propojení těchto kruhů jsou polyfenoly rozděleny do několika tříd – flavonoidů, fenolových kyselin, stilbenů a lignanů [15], [16], [19].

Polyfenoly se běžně nachází v potravinách rostlinného původu (zelenina, ovoce, ořechy, obiloviny), a také v nápojích (víno, cider, pivo, čaj a kakao) [19]. Dlouhodobá konzumace potravin bohatých na polyfenoly má prospěšný vliv na lidské zdraví. Dále zabraňují rozvoji rakoviny v těle, působí proti kardiovaskulárním onemocněním, diabetu, osteoporóze i neurodegenerativním onemocněním [17], [18].

2.3.2 Flavonoidy

Základní strukturou je flavan, který se skládá z 15 atomů uhlíku, uspořádaný do třech kruhů (C6-C3-C6), které jsou označeny A, B a C (Obrázek 1). Různé třídy flavonoidů

se liší ve stupni oxidace a substitucí na kruhu C, zatímco jednotlivé sloučeniny v rámci jedné třídy se liší substitucí na kruhu A a B [20]. Flavonoidy, ve kterých je kruh B vázán v poloze 4, se nazývají neoflavonoidy, zatímco ve kterých je kruh B vázán v poloze 2, lze dále rozdělit do několika podskupin na základě strukturních znaků kruhu C. Do těchto podskupin řadíme flavony, flavonoly, flavanoly, flavanoly, katechiny, antokyany a chalkony [20].



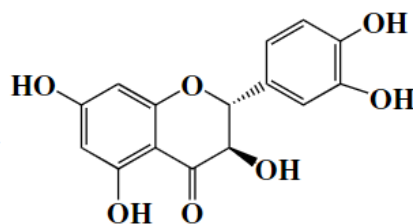
Obrázek 5: Základní struktura flavanu [23]

Flavonoidy dávají potravinám chuť a barvu, dále poskytují prevenci před oxidací tuků a chrání vitaminy a enzymy [21]. Jako fytochemické látky nemohou být flavonoidy syntetizovány v lidském ani živočišném organismu. Flavonoidy mají účinný antioxidační efekt, kterým je vychytávání volných radikálů, dále mají schopnost chelatovat kovové ionty, jako je železo nebo měď [23].

2.3.3 Taxifolin

Taxifolin (neboli dihydroquercetin) je flavanon, který je běžnou složkou ostropestřce mariánského. Flavonolignany, o kterých pojednává následující kapitola, jsou syntetizovány radikálovou reakcí z prekurzorů taxifolinu a koniferylalkoholu [24].

Taxifolin se hojně nachází se v olivovém oleji, hroznech, citrusových plodech a cibuli. V biologických testech *in vitro* bylo zjištěno, že je silným antioxidantem a má antiradikálovou aktivitu, ve srovnání se standardními antioxidačními sloučeninami. Taxifolin může sloužit k minimalizaci a prevenci oxidace lipidů v potravinách nebo farmaceutických výrobcích, zpomalující tvorbu škodlivých oxidačních produktů. Rovněž zachovává kvalitu a prodlužuje trvanlivost potravin nebo léčivých přípravků [25].



Obrázek 6: Strukturní vzorec taxifolinu [24]

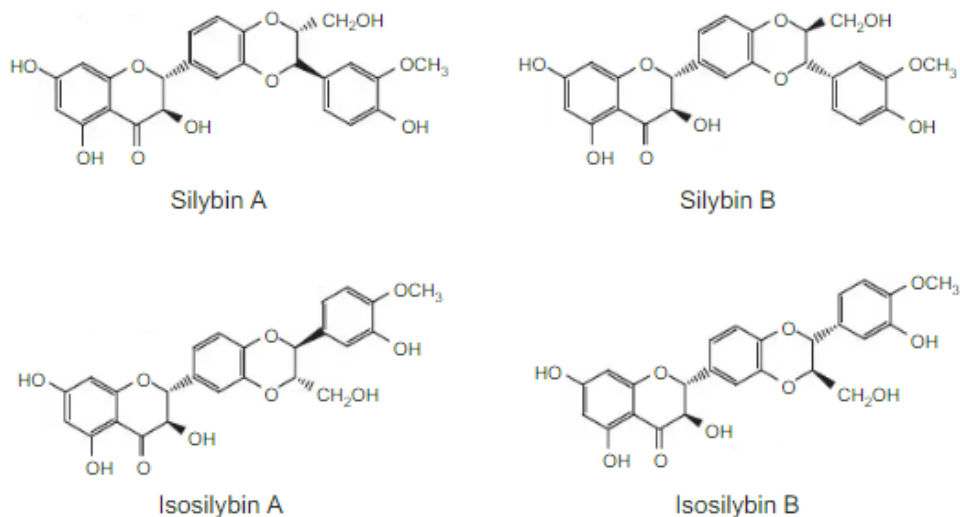
2.3.4 Flavonolignany

Biosynteticky vznikají flavonolignany oxidativní vazbou mezi flavonoidní částí a fenypropanoidní částí. Flavonoidní část může být taxifolin, eryodiktyol, naringerin, chrysoeriol, tricín, luteonin, apigenin nebo kvercetin. Koniferylalkohol, patřící do skupiny monolignolů, tvoří fenypropanoidní část ve většině flavonolignanů. Přímé prekurzory flavonolignanů, flavonoidy a monolignany, jsou syntetizovány fenypropanoidovou dráhou transformující fenylyalanin na 4-kumaroyl-CoA [28], [30].

Aktivními složkami ostropestřce jsou flavonolignany, silybin A a B, silychristin A, isosilychristin a silydianin, souhrnně známé jako silymarin, s empirickým vzorcem $C_{25}H_{22}O_{10}$. [26].

2.3.5 Silybin (silibinin)

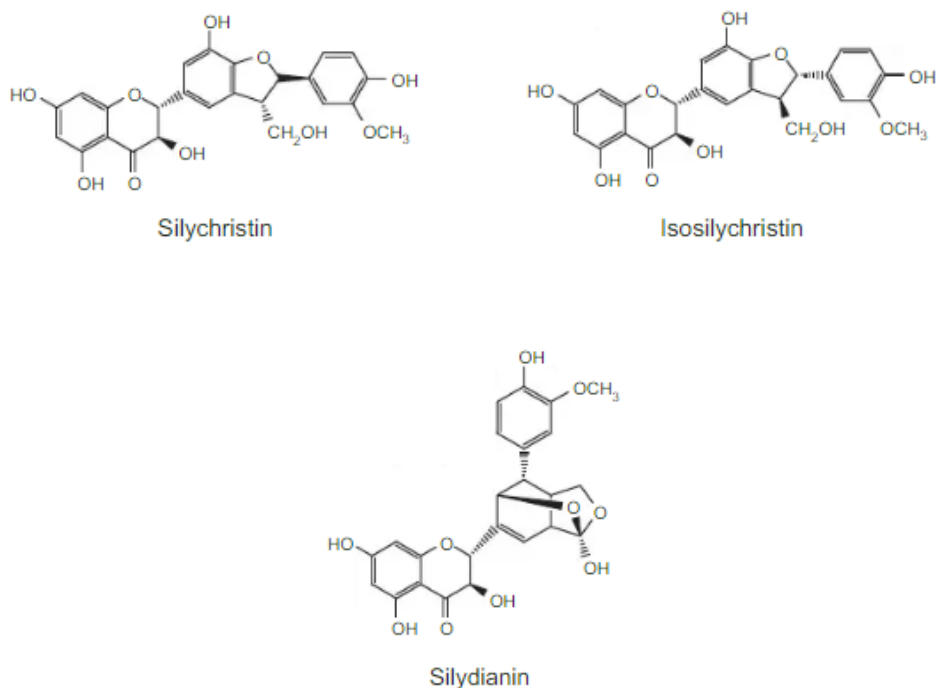
Silybin představuje asi 50 % až 70 % silymarinového extraktu. Silybin lze rozdělit na dva diastereoizomery 1:1, silybin A a silybin B. Kromě toho může být silybin přítomen jako isosilybin, což je směs dvou diastereoizomerních sločenin isosilybinu A a B v poměru 1:1. [27]



Obrázek 7: Strukturální vzorce silybinu A a B, isosilybinu A a B [29]

2.3.6 Silychristin

Silychristin je druhým nejobsáhlejším flavonolignanem v silymarinovém komplexu. Přírodní silychristin je směsí dvou diastereoizomerů – silychristin A a B v poměru 95:5. Poměrně náročná je separace silychristinu, přičemž společně se silychristinem je eluován i flavonolignan silydianin [31].



Obrázek 8: Strukturální vzorce silychristinu, isosilychristinu a silydianinu [29]

2.4 Farmakologické účinky

2.4.1 Antioxidační účinky

Silybin má vysokou antioxidační aktivitu, díky obsahu fenolické složky v jeho sloučenině [32]. Zháší volné radikály, které vyvolávají lipidovou peroxidaci – poškozování buněčných membrán – vedoucí k tvorbě mutagenních látek [26]. Dále působí prostřednictvím kontroly exprese a aktivity antioxidačních systémů, jako jsou enzymy superoxid dismutáza, kataláza, glutathion peroxidáza a glutathion reduktáza. Také působí i na neenzymatické antioxidační systémy, zvyšující hladiny α -tokoferolu, β -karotenu a askorbátu [33].

2.4.2 Protizánětlivé účinky

Existuje mnoho důkazů, že silymarin je silné protizánětlivé činidlo. Inhibuje transkripční faktor NF- κ B („jaderný faktor kappa B“), který reguluje expresi různých genů a účastní se zánětlivého procesu při tvorbě nádorových buněk. Dále má schopnost potlačit tvorbu cytokinů a enzymů, podporující tvorbu zánětu [34], [35].

2.4.3 Hepatoprotektivní účinky

Silymarin se používá k léčbě několika jaterních onemocnění charakterizovaných degenerativní nekrózou a funkčním poškozením včetně chronických jaterních poruch [36].

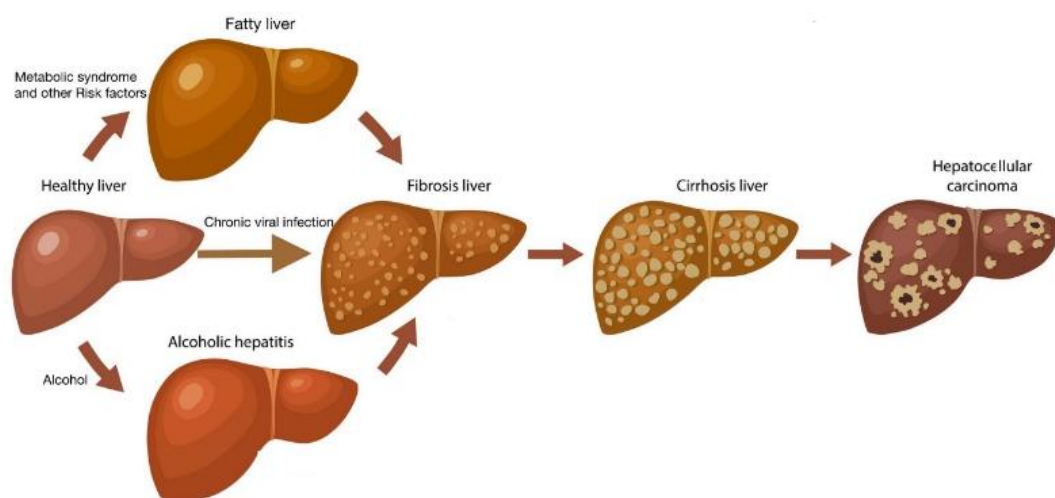
Cirhóza: Metabolismus ethanolu zahrnuje tvorbu volných radikálů, která v jaterních buňkách vede k oxidačnímu stresu. Silymarin úspěšně působí proti alkoholické cirhóze svými antioxidačními a hepatoprotektivními mechanismy, obnovující normální biochemické parametry jater [36].

Hepatitis: U pacientů s akutní virovou hepatitidou silymarin zkracuje dobu léčby a ukazuje zlepšení sérového bilirubinu a sérových jaterních enzymatických hladin. Biochemické hodnoty se u pacientů léčených silymarinem vrátí k normálu v kratším čase [37]. Užívání silymarinu s pokročilým onemocněním jater související s hepatitidou C, je spojeno se sníženou progresí z fibrózy do cirhózy, ale nemá žádný vliv na klinické výsledky [38].

Fibróza jater: Fibróza jater může vést ke změně jaterní architektury vedoucí k jaternímu selhání a jaterní encefalopatii. Přeměna hvězdčovitých buněk na myofibroblasty je hlavním dějem při fibrogenези. Léčba silymarinem výrazně inhibuje proces fibrogenезе u pacientů [39].

Obnova jaterní tkáně: Silymarin stimuluje regeneraci jaterní tkáně a podporuje syntézu proteinů v poraněných játrech. V *in vivo* a *in vitro* experimentech prováděných na játrech krys, z nichž byla odstraněna část orgánu, produkoval silybin významné zvýšení tvorby ribozomů a syntézy DNA. Syntéza proteinů ovšem probíhala pouze na poškozených játrech, nikoliv u zdravých [39].

Otrava muchomůrkou zelenou (Amanita phalloides): Muchomůrka zelená obsahuje amatoxiny a falotoxiny. Hlavní komponentou amatoxinů je α -amanitin, který je spolu s β -amanitinem zodpovědný za toxický účinek. Jakmile se amanitiny dostanou do jater, jsou vychytávány jaterními buňkami a dochází k jejich transportu do hepatocytů, kde vyvolávají jejich rozsáhlou nekrózu a degeneraci. Doporučenou terapií při intoxikaci muchomůrkou zelenou je silybin v kombinaci s N-acetyl-cysteinem. Silybin má přímé hepatoprotektivní účinky, přerušuje enterohepatální recirkulaci amanitinu, inhibuje vazbu amanitinu na membrány hepatocytů, soutěží s amanitinem při transmembránovém transportu a inhibuje průnik amanitinu do jaterních buněk. Terapie se provádí v dávkách 20–50 mg/kg/den nitrožilně ve čtyřech dvouhodinových infuzích, terapie má trvat 4–5 dní [40].



Obrázek 9: Fáze jaterního onemocnění [41]

2.4.4 Protirakovinné účinky

Vzhledem k velkému počtu studií provedených za účelem zkoumání molekulárních účinků silymarinu lze tvrdit, že většina mechanismů zapojených do buněčného růstu a apoptózy může být ovlivněna silymarinem jako přírodní protirakovinovou sloučeninou [34], [42]. Možné využití silymarinu v prevenci onkologických onemocnění je například předcházení vzniku rakoviny kůže způsobené UVA zářením. *In vitro* studie na lidských keratinocytech ozářených UVA zářením a vystaveným působením látek z ostropestřce, dokazuje zmírnění škodlivých účinků záření – snížení produkce reaktivních forem kyslíku, snížení peroxidace membránových lipidů a menší poškození DNA buněk [43].

2.4.5 Účinky na laktaci

Tradičně byl ostropestřec používán kojícími matkami pro stimulaci produkce mléka [14]. Prolaktin je hlavním laktogenním hormonem a nedávno bylo prokázáno, že ostropestřec významně zvyšuje hladiny cirkulujícího prolaktinu u samic potkanů [44].

2.4.6 Toxicita a nežádoucí účinky

Studie z roku 2019 uvádí, že ostropestřec mariánský je pro člověka v terapeutických dávkách bezpečný a má málo nežádoucích účinků, jako jsou žaludeční potíže. Studie také upozorňuje na nedostatečné množství informací o bezpečnosti užívání ostropestřce u těhotných žen [45].

2.5 Doplnky stravy

Doplnky stravy jsou v České republice obecně v oblibě, tři čtvrtiny Čechů užívají doplnky stravy, nejčastěji jsou to vitaminy C a D, mezi minerály je nejvíce oblíbený hořčík [48].

Podle zákona č. 110/1997 Sb., v platném znění, je doplněk stravy definován jako: „... *potravina, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu a která je koncentrovaným zdrojem vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravině samostatně nebo v kombinaci, určená k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích.*“ [46].

Doplnky stravy jsou potraviny, nikoliv léčiva, a vztahují se tedy na ně příslušná ustanovení potravinového práva. Oproti *léčivým přípravkům* nejsou posuzovány a schvalovány Státním ústavem pro kontrolu léčiv. Taktéž jejich účinnost není doložena klinickými studiemi, které podléhají přísným kritériím [47].

Označování doplňků stravy

- nesmí přisuzovat doplňkům stravy vlastnosti týkající se prevence, léčby nebo vyléčení lidských onemocnění nebo odkazovat na tyto vlastnosti,
- nesmí obsahovat žádné tvrzení uvádějící nebo naznačující, že vyvážená a pestrá strava obecně nemůže poskytnout dostatečné množství vitaminů nebo minerálních látek,
- výživová a zdravotní tvrzení se mohou uvádět za podmínek stanovených nařízením (ES) č. 1924/2006 [46]

2.5.1 Bezpečnost

Se vzrůstajícím zájmem o zdravý životní styl roste poptávka nejen po zdravých potravinách, ale i po různých doplňcích stravy. Trh tak nabízí velké množství českých i zahraničních výrobků s doplňky stravy. Vlivem konvenčního zemědělství se v těchto

produktech nacházejí kontaminanty jako pesticidy, těžké kovy, mykotoxiny a jiné toxické látky, které mohou představovat vážná zdravotní rizika [49]. Bezpečnost doplňků stravy na trhu v ČR je kontrolována Státní zemědělskou a potravinářskou inspekcí (SZPI) [50].

2.5.2 Kontaminanty v extraktech ostropestřce mariánského

Podle studie z roku 2019 bylo zjištěno, že komerční silymarinový extrakt může obsahovat vysoké koncentrace mykotoxinů, pesticidů i značnou mikrobiologickou kontaminaci. Tato skutečnost může odpovídat za nekonzistentní výsledky klinických pozorování u pacientů s onemocněním jater. Studie upozorňuje na nutnost zavedení přísných kontrol chemického a mikrobiologického složení komerčních extraktů z ostropestřce mariánského [51]. Možná kontaminace mykotoxiny je způsobována nevhodným sběrem rostliny ostropestřce, kdy sběr je prováděn za vlhkého a neslunného počasí, z důvodu co nejnižší ztráty semen ostropestřce z jeho květenství [52]. Příčinou vzniku mykotoxinů je také nerovnoměrné dozrávání plodů v hlávkách [53].

2.5.3 Aktuálně dostupné produkty z ostropestřce mariánského v ČR

Semena

Semena ostropestřce mariánského se prodávají nedrcená i drcená. Obecně se doporučuje semena nadrtit přímo před konzumací, aby nedošlo ke ztrátě účinných látek [54]. Semena lze konzumovat samostatně, jako součást pokrmů nebo přípravou nálevu. Pokrutiny zbylé po lisování oleje se používají do krmných směsí pro hospodářská zvířata, jako jsou koně, skot, drůbež a selata. Dále je olej ze semen přidáván do krmiv koní a psů, jelikož ostropestřec zlepšuje stav jejich srsti i jejich pokožky [55].



Obrázek 10: Semena ostropestřce mariánského [56]

Oleje

Olej z ostropestřce je k dostání jako jednodruhový olej za studena lisovaný, je tak doporučený výhradně k použití ve studené kuchyni. Zevní použití je doporučováno k ošetření křečových žil, ekzémů i popálenin.

Kapsle a tablety

Český trh nabízí široký výběr tablet a kapslí z extraktů semen ostropestřce. Obecně funkce těchto produktů má přispívat k normální funkci jater, chránit buňky před oxidativním stresem a detoxikovat tělo. Kapsle a tablety obsahující extrakt z ostropestřce jsou doplňovány o vitaminy a jiné extrakty z bylin (např. smetanka lékařská, tollice vojtěška), které také přispívají ke správné funkci jater. Dostupný je také silybin-fosfatidylcholinový komplex, který je rychleji vstřebatelný a účinněji absorbován než samotný silymarin [57].

Tinktury

Tinktury se vyrábějí z ethanolového (30-40% obj.) extraktu semen, ale i z pupenů. Ostropestřec se dále vyskytuje ve směsných tinkturách na podporu jater.

Čaje

Jak bylo zmíněno výše, ze sušených plodů ostropestřce lze připravovat nálev. Dostupné jsou čaje obsahující pouze drcená semena ostropestřce, nebo drcená semena ostropestřce součástí bylinných směsí pro podporu detoxikace organismu.

Extrakty z plodů se nachází i běžné v kosmetice, konkrétně v šamponech, masážních olejích a hydratačních krémech.

2.6 Současné metody analýzy ostropestřce a jeho produktů

Vhodná metoda pro chemickou analýzu musí vycházet z fytochemických látek nacházející se v rostlině. Pro výrobu vzorků se využívá extrakce rostlinného materiálu bohatého na biologicky aktivní látky. Silymarinový komplex obsahuje mnoho flavonolignanů, které lze dělit separačními metodami, ovšem kromě flavonolignanů ze silymarinového komplexu ostropestřce, lze separovat i jiné bioaktivní látky (např. polyfenoly). Pro tuto komplexní separaci bioaktivních látek, které jsou po předchozí derivatizaci převedeny na těkavější produkty, se využívá metoda plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií [58]. Silymarinový komplex dále obsahuje elektroaktivní látky, které byly studovány elektroanalytickými metodami, například ve farmaceutických výrobcích [59], [60]. Z elektromigračních metod je využívána kapilární elektroforéza [61], [62]. Mezi nejčastější instrumentální separační techniky se řadí vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [63]–[67] s reverzní fází kvůli hydrofobní povaze flavonolignanů. Nejčastěji je metoda HPLC v kombinaci s UV-spektrofotometrickým detektorem [63], [65], [66] a hmotnostní spektrometrií [64], [66]. Existují články, které porovnávají HPLC metodu s NMR metodou pro kvantitativní analýzu [62], [68].

3 Cíle práce

V rámci bakalářské práce jsou řešeny dílčí úkoly:

- V teoretické části podat širší informace o bodlákovité bylině – ostropestřci mariánském
- studium elektroaktivity vybraných látek – taxifolinu a silibininu – pomocí cyklické voltametrie
- na základě elektroaktivní povahy studovaných látek vyvinout jednoduchou, isokratickou a časově nenáročnou metodu HPLC s elektrochemickou detekcí
- tuto metodu následně aplikovat na reálné vzorky rostlinných extraktů
- vyhodnocení a diskuze výsledků.

4 Experimentální část

4.1 Instrumentální vybavení

Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie byla realizována na potenciostatu Autolab (Metrohm AG, Herisan, Švýcarsko) s průtokovou amperometrickou celou (ESA Inc., model 5040) a borem dopovanou diamantovou pracovní elektrodou (ESA Inc., Chelmsford, MA, USA).

Vysokoučinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

Chromatografický systém pro HPLC analýzu se skládal z isokratické pumpy (LC-10AD SHIMADZU, Japonsko) s tlumičem pulsů, analytické dvoukanálové coulometrické cely (Model 5020) s předřazenou guard celou na odstranění nečistot v mobilní fázi, umístěnou před dávkovačem (vše ESA Inc., Chelmsford, MA, USA). Pro separaci byla použita kolona s reverzní fází C18 5 μm , 250 mm x 2,1 mm I.D (Phenomenex, USA). Prostřednictvím manuálního dávkovacího ventilu vybaveného 20 μl smyčkou Rheodyne (Rheodyne, Cotati, CA, USA) byly roztoky standardů do systému nastříkovány pomocí skleněné stříkačky o objemu 25 μl (Hamilton, Reno, NV, USA). Roztoky vzorků byly nastříkovány skleněnou stříkačkou o objemu 50 μl (Hamilton, Bonaduz, Švýcarsko). Veškerý spojovací materiál (fittingy, ferulky, kapiláry a těsnění) byly vyrobeny z polymerního materiálu PEEK[®]. Nahrávání chromatografických dat bylo prováděno pomocí softwaru Clarity (DataApex, Praha, Česká republika). Výsledky měření byly zpracovány pomocí MS Excel (Microsoft, USA).

4.2 Chemikálie

- methanol (HPLC-gradient grade, Fisher Scientific, UK)
- ethanol (HPLC-super gradient, PENTA, Česká republika)
- dimethylsulfoxid
- dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- kyselina trihydrogenfosforečná (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- taxifolin, p.a. > 85 % (Sigma-Aldrich, USA)
- silibinin, p.a. > 98 % (Sigma-Aldrich, USA)
- deionizovaná voda (Milipore, Francie)

4.3 Vzorky

K analýze byly použity dva vzorky tinktur z ostropestřce mariánského.

- Ostropestřec mariánský – tinktura z pupenů ostropestřce mariánského (výrobce: Mgr. Jarmila Podhorná, Naděje, ČR)
- Ostropestřec mariánský – bylinné kapky, 10% výtažek z plodu ostropestřce mariánského ve 40 % lihu (výrobce: Grešík Valdemar, ČR)



Obrázek 11: Vzorky používané k analýze od výrobců Naděje (nalevo) a Grešík Valdemar (napravo), (foto autor)

4.4 Pracovní postup

4.4.1 Cyklická voltametrie

Při měření cyklické voltametrie byl zvoleno tříelektrodové zapojení: borem dopovaná elektroda jako pracovní elektroda, referentní Pd/H₂ elektroda, pomocnou elektrodu tvořila platinová elektroda. Měření probíhalo v rozsahu -500 až 1800 mV a rychlost skenu pro cyklickou voltametrii byla 100 mV/s. Byly měřeny dva opakované cykly. Všechna voltametrická měření byla prováděna v průtokové amperometrické cele (viz kap. 4.1) z důvodu co nejmenšího objemu vzorku. Pro voltametrická stanovení byl použit standard taxifolinu ($c=1,06$ mg/ml) a standard silibininu ($c=1,33$ mg/ml). Oba standardy byly před měřením ještě naředěny fosfátovým pufrům v poměru 1:1.

4.4.2 Chromatografické podmínky

Měření probíhalo při potenciálu $E_1 = 100$ mV na prvním kanále a $E_2 = 500$ mV (vs. Pd/H₂) na druhém kanále. Citlivost potenciostatu byla nastavena na $20 \mu\text{A}\cdot\text{V}^{-1}$. Průtoková rychlost mobilní fáze byla nastavena na 0,3 ml/min. Nástřik vzorků a standardů byl 10 μl . Teplota byla 25°C.

4.4.3 Příprava pufru a mobilní fáze

Dihydrogenfosforečnan sodný byl přesně navážen na analytických vahách a následně rozpuštěn v deionizované vodě. Hodnota pH pufru byla upravena titrací koncentrovanou kyselinou trihydrogenfosforečnou. Poté byl okyselený roztok pufru přefiltrován vakuovou filtrací, velikost pórů filtru byla 0,2 μm . Takto připravený roztok fosfátového pufru o koncentraci 25 mmol/l a pH 3,03 byl nadále používán k přípravě mobilní fáze (MF). Zásobní roztok pufru byl skladován v lednici při teplotě 3°C.

K HPLC analýze byl připraven roztok mobilní fáze o složení methanol:fosfátový pufr (40:60, v/v). Takto připravený roztok MF byl před analýzou vždy odplyněn pomocí helia.

4.4.4 Příprava standardů

Standard taxifolinu byl přesně navážen na analytických vahách a rozpuštěn v methanolu, poté byl přidán stejný objemový podíl fosfátového pufru. Takto připravený zásobní roztok byl následně ještě 10x zředěn fosfátovým pufrem. Výsledná koncentrace standardního roztoku připraveného k analýze byla 0,1 mg/ml.

Standard silibininu byl přesně navážen na analytických vahách a napřed rozpuštěn v dimethylsulfoxidu, poté byl přidán stejný objemový podíl methanolu. Takto připravený zásobní roztok byl nadále 5x zředěn fosfátovým pufrem. Výsledná koncentrace standardního roztoku připraveného k analýze byla 0,19 mg/ml. Oba standardní roztoky byly skladovány v lednici při teplotě 3°C.

4.4.5 Příprava směsi dvou standardů k analýze HPLC

V předchozí podkapitole (viz 4.4.4) byly popsány přípravy jednotlivých roztoků standardů k analýze. Jedním z cílů této práce je vyvinout isokratickou metodu vhodnou pro simultánní separaci taxifolinu a obou diastereoizomerů silibininu. Směs byla

připravena smícháním jednoho dílu standardního roztoku taxifolinu o koncentraci 0,1 mg/ml se stejným dílem standardního roztoku silibininu o koncentraci 0,1 mg/ml.

4.4.6 Příprava vzorků k analýze HPLC

Oba vzorky tinktur z ostropestřce byly ředěny v poměru 1:3. Jeden díl tinktury byl ředěn trojnásobným množstvím fosfátového pufru.

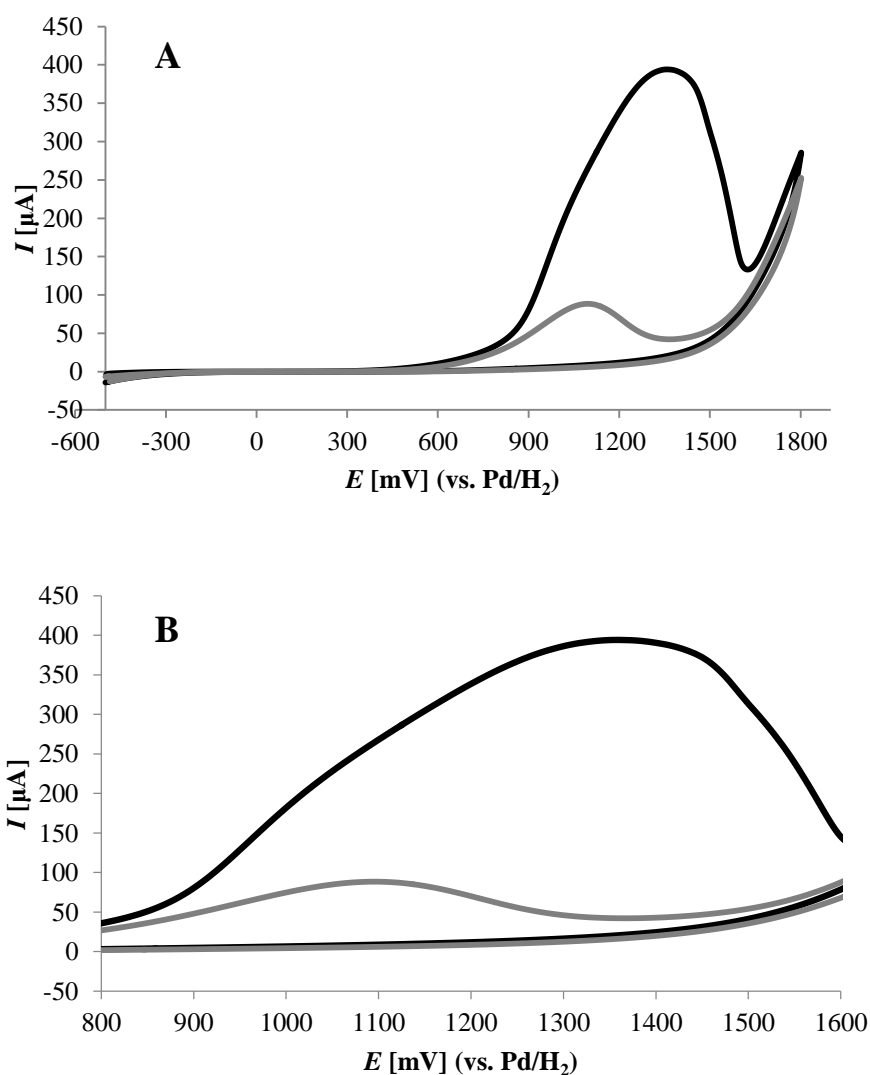
4.4.7 Příprava vzorku k analýze HPLC metodou spikování

Vzorek bylinných kapek Grešík byl zředěn 1:3 s 10x zředěným roztokem standardu silibinu a taxifolinu a stejným dílem pufru.

5 Výsledky a diskuze

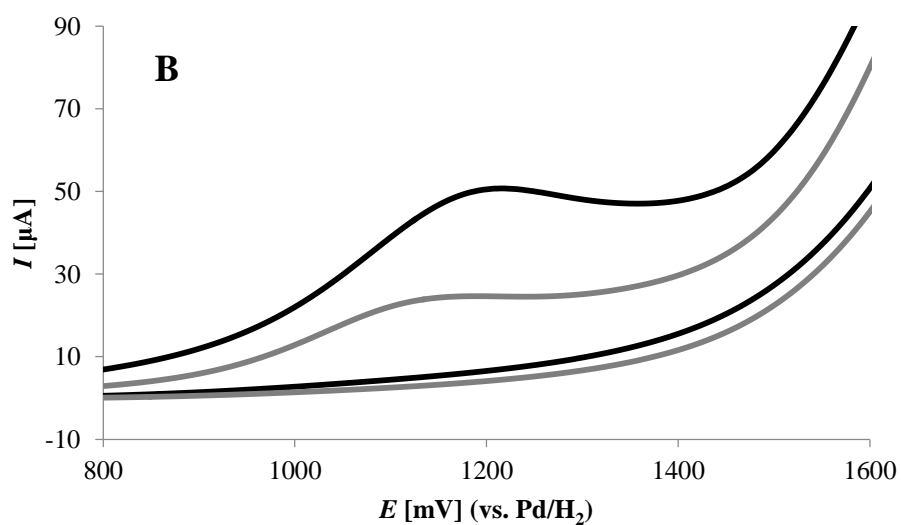
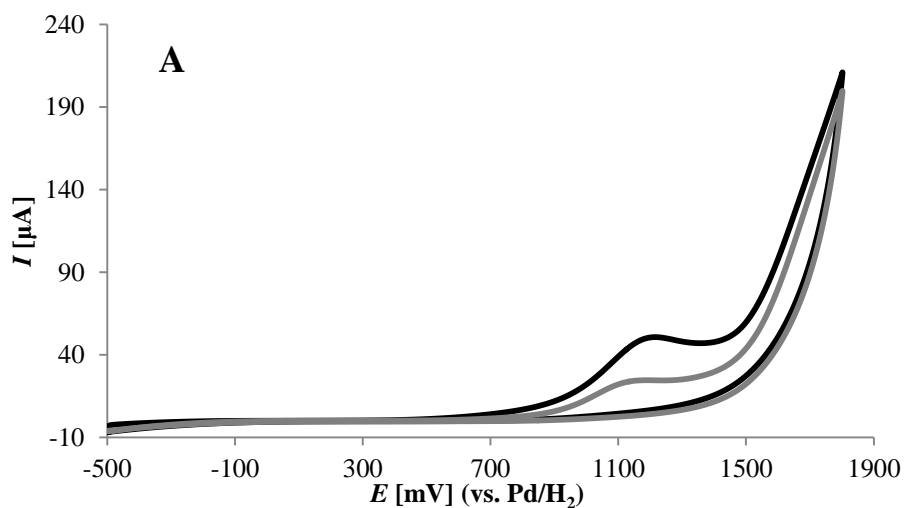
Experimentální část se zabývá studiem elektroaktivity standardních látek pomocí cyklické voltametrie. Následné využití elektrochemické detekce se, vzhledem k elektroaktivní povaze látek, tedy jeví v kombinaci s účinnou HPLC metodou jako výhodné. Pro separaci a identifikaci byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s dvoukanálovou coulometrickou detekcí, která poskytuje vysokou selektivitu detekce. Metoda HPLC-ED je aplikována pro simultánní separaci taxifolinu, silibininu A a silibininu B v rostlinných extraktech (tinkturách). Výsledky měření jsou uvedeny v následujících podkapitolách.

5.1 Studium elektrochemické aktivity standardů taxifolinu a silibininu



Obrázek 12 A, B: Cyklovoltamogram standardu taxifolinu

Na Obr. 12A (výřez Obr. 12B) je zobrazen cyklický voltamogram taxifolinu. V analytické oblasti je viditelný jeden signál v prvním skenu při 1350 mV, v druhém skenu při 1100 mV (vs. Pd/H₂). Na obrácené katodické křivce nebyl detekován žádný odpovídající katodický pík, jedná se o chemicky ireverzibilní katodovou reakci.

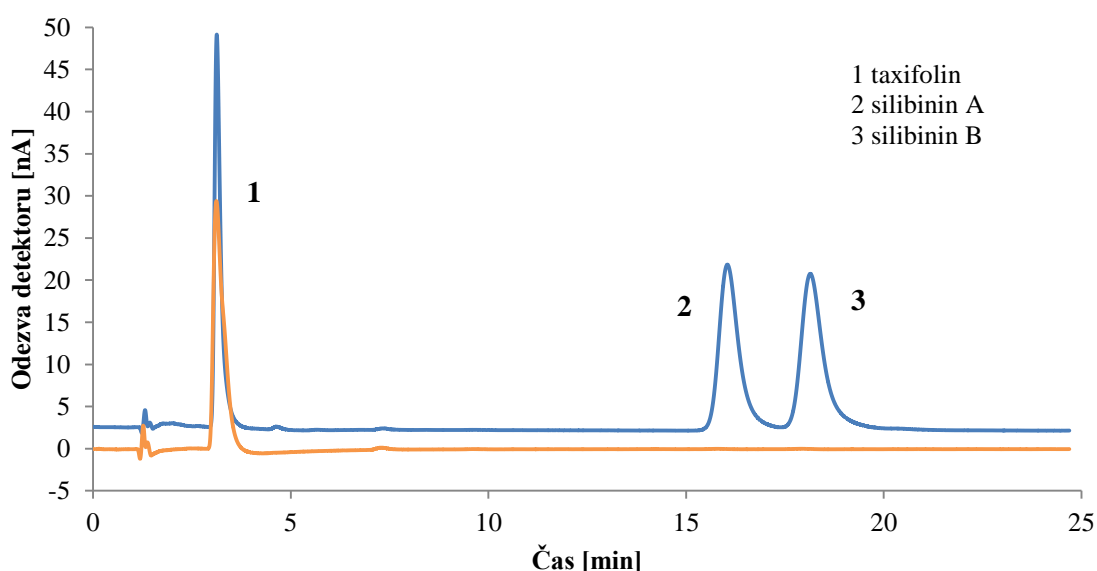


Obrázek 13A,B: Cyklovoltamogram standardu silibininu

Na Obr. 13A (výřez Obr. 13B) je zobrazen cyklický voltamogram taxifolinu. V analytické oblasti je viditelný jeden signál v prvním skenu při 1200 mV, v druhém skenu při 1150 mV (vs. Pd/H₂). Na obrácené katodické křivce opět nebyl detekován žádný odpovídající katodický pík, jako v případě taxifolinu se jedná o chemicky ireverzibilní katodovou reakci.

Z cyklovoltamogramů na Obr. 12A,B a Obr. 13A,B je patrné, že při druhých skenech se snižovala proudová odezva látek. Příčinou mohl být malý objem roztoku, který mohl být již při druhém skenu z většiny vyčerpán. Cyklická voltametrie byla použita jako doplňková metoda k obecnější charakterizaci elektrochemických vlastností studovaných látek. Jelikož cyklická voltametrie byla prováděna v jiném uspořádání a s použitím jiné pracovní elektrody, výsledky nejsou zcela srovnatelné se systémem HPLC-ED s průtokovým systémem a coulometrickou celou.

5.2 Analýza směsi standardů taxifolinu a silibininu

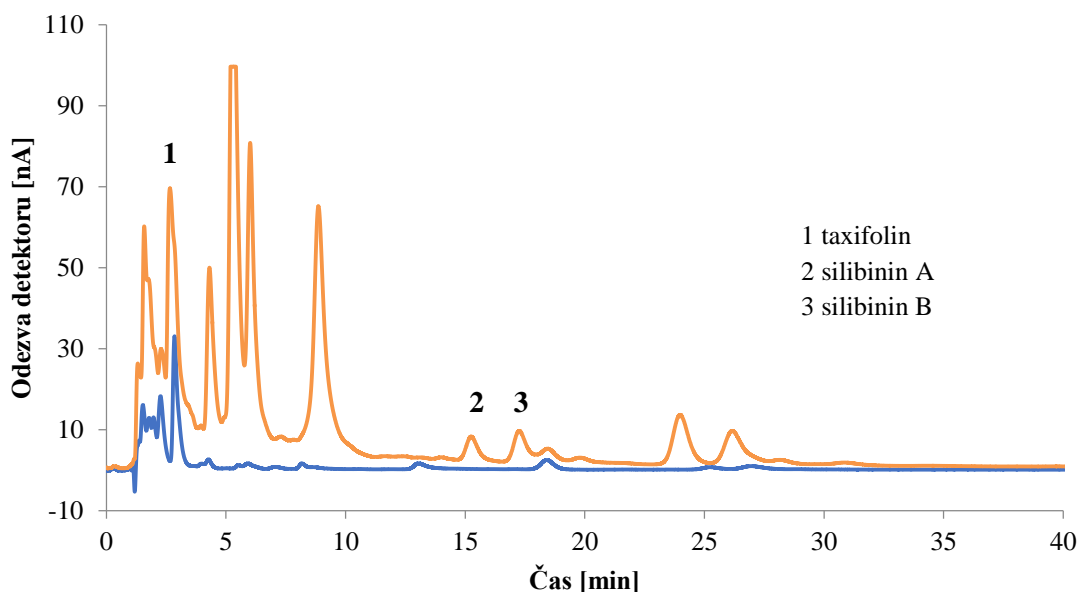


Obrázek 12: Chromatogram směsi standardů taxifolinu ($c=0,1$ mg/ml) a silibininu ($c=0,19$ mg/ml). Na prvním detekčním kanále (modrá) byl vložen potenciál $E_1=100$ mV, na druhém, detekčním kanále (červená) byl potenciál $E_2=500$ mV (vs. Pd/H₂). Druhý kanál je z důvodu větší přehlednosti posunut o +20mV na ose y – Odezva detektoru.

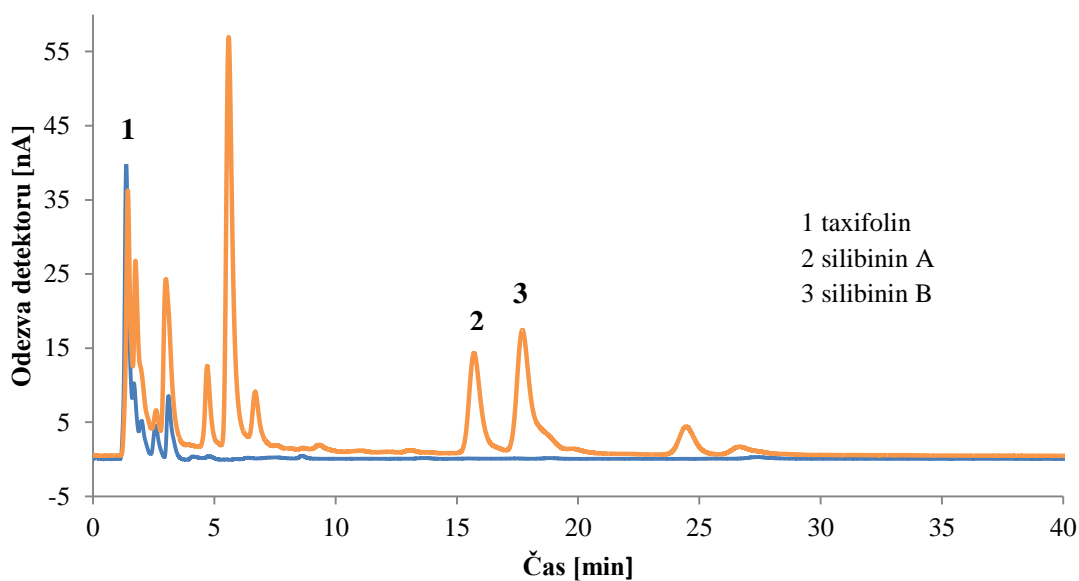
Na Obr. 12 je výsledný chromatogram směsi standardů taxifolinu a silibininu. Taxifolin se eluoval v retenčním čase 3,12 min, silibinin A se eluoval v čase 16,01 min a silibinin B v čase 18,11 min. Na prvním detekčním kanále (červená) byl vložen potenciál $E_1=100$ mV (vs. Pd/H₂), při tomto potenciálu lze pozorovat pík taxifolinu, ovšem silibinin vykazuje zanedbatelnou odezvu. Taxifolin je tedy snadno oxidovatelná látka a oxiduje se už při nižším vloženém potenciálu. Na druhém detekčním kanále (modrá) byl potenciál $E_2=500$ mV (vs. Pd/H₂) a při tomto potenciálu již lze pozorovat signál obou diastereoizomerů silibininu. Při výběru vhodného napětí se zohledňovala selektivita.

Na separaci dvou diastereoizomerů standardu silibininu měla zásadní vliv mobilní fáze. Při optimalizaci metody byly vyzkoušeny různé poměry methanolu a fosfátového pufru, byla vyzkoušena i ternární mobilní fáze s přídavkem acetonitrilu. Nejlepší separace dvou diastereoizomerů probíhala při složení mobilní fáze methanol:fosfátový pufr (40:60, v/v). Standardy byly také proměřovány UV-spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce 288 nm, ovšem kvůli jeho nižší citlivosti byl použit pouze jako kontrolní detektor. V chromatogramu se také objevovaly nečistoty, které pocházely ze standardu taxifolinu, jehož deklarovaná čistota byla > 85%.

5.3 Analýza reálných vzorků z ostropestřce mariánského



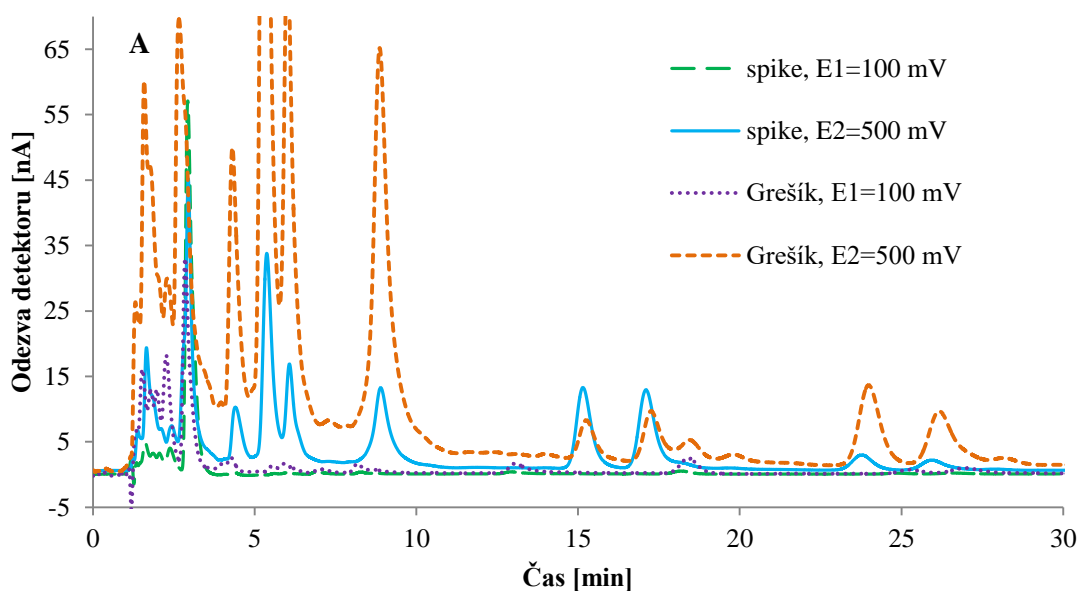
Obrázek 13: Chromatogram tinktury z ostropestřce mariánského – bylinné kapky výrobce Grešík Valdemar. Na prvním detekčním kanále (modrá) byl vložen potenciál $E_1=100\text{ mV}$, na druhém, detekčním kanále (červená) byl potenciál $E_2=500\text{ mV}$ (vs. Pd/H_2).



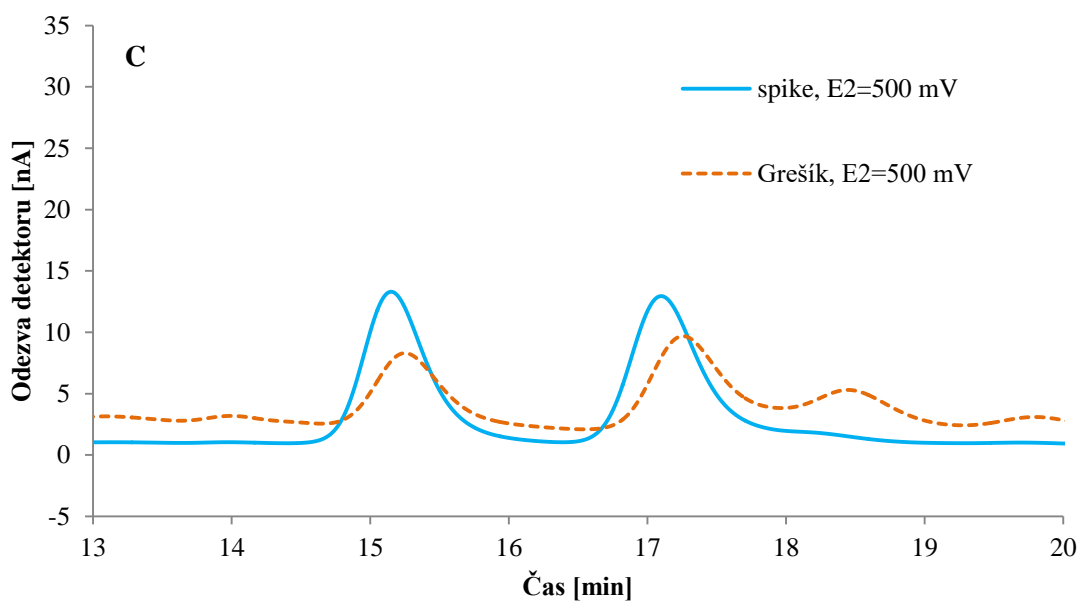
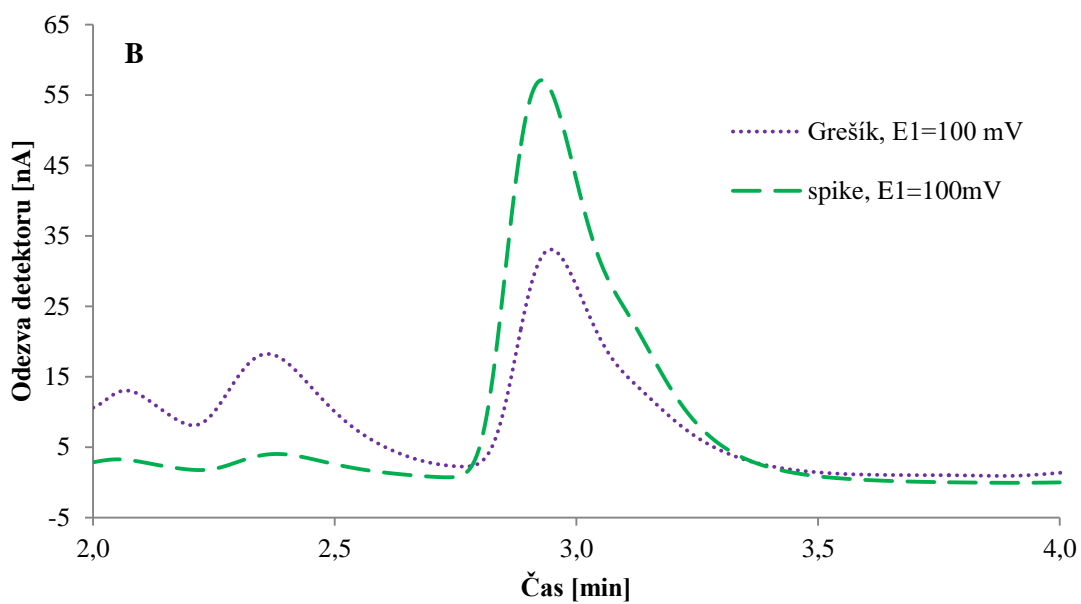
Obrázek 14: Chromatogram tinktury z ostropestřce mariánského – tinktura z pupenů ostropestřce mariánského, výrobce Naděje. Na prvním detekčním kanále (modrá) byl vložen potenciál $E_1=100\text{ mV}$, na druhém, detekčním kanále (červená) byl potenciál $E_2=500\text{ mV}$ (vs. Pd/H_2).

Pro přímé srovnání byly obě tinktury před vlastní analýzou ředěny stejným způsobem 1:3 s podílem fosfátového pufru (viz kapitola 4.4.6), kvůli nižší eluční síle vzorku a omezení rozšiřování píku. Při analýze obou tinktur se jednotlivé látky od sebe dostatečně separovaly. Při srovnávání chromatogramů reálných vzorků se jednotlivé tinktury od sebe výrazně nelišily zastoupením obsažených látek. Dále lze ze srovnávání usoudit, že se látky lišily spíše svým profilem obsahových látek (Obr. 12-13). Tento rozdíl může být ovlivněn mnoha faktory, přičemž hlavní rozdíl mezi analyzovanými tinkturami je ten, že účinné látky od firmy Naděje jsou extrahovány z pupenů ostropestřce, nikoli ze semen. Ostatní píky na chromatogramech Obr. 12-13 odpovídají látkám, které jsou v tinkturách přítomny, v naší analýze tyto látky nebyly identifikovány, neboť nebyly k dispozici příslušné standardy. Podle literatury [69], [70] lze usoudit, že v tinkturách jsou dále přítomny i látky: silychristin, silydianin, isosilybin A a isosilybin B.

5.4 Ověření přítomnosti bioaktivních látek ve vzorcích metodou přidavku standardu (spikování)



Obrázek 15 A: Chromatogram tinktury z ostropestřce mariánského – bylinné kapky Grešík Valdemar. Ověření přítomnosti silibininu a taxifolinu metodou přidavku standardu („spikování“). Na první detekční kanál byl vložen potenciál $E_1=100$ mV, na druhém detekčním kanále byl potenciál $E_2=500$ mV (vs. Pd/H₂).



Obrázek 15 B, C: Výřez chromatogramu tinktury z ostropestřce mariánského – bylinné kapky Grešík Valdemar. Ověření přítomnosti silibininu a taxifolinu metodou přidavku standardu („spikování“). Na první detekční kanál byl vložen potenciál $E_1=100$ mV, na druhém detekčním kanále byl potenciál $E_2=500$ mV (vs. Pd/H₂).

Z Obr. 15A lze potvrdit přítomnost obou diastereoizomerů silibininu a taxifolinu v bylinných kapkách od výrobce Grešík Valdemar. Pro ověření byla použita metoda přidavku standardu tzv. „spikování“:

- Obr. 15B je přiblížen, aby byl identifikován pík taxifolinu v bylinné tinktuře Grešík (fialová). Přidáním spiku – taxifolinu – do vzorku je potvrzena identita látky zvýšením signálu příslušného píku (zelená). Měřeno prvním detekčním kanálem při $E_1=100$ mV.
- Obr. 15C je přiblížen, aby byly přehledněji identifikovány píky silibininu A a B v bylinné tinktuře Grešík (oranžová). Přidáním spiku – silibininu – do vzorku je potvrzena identita analyzované látky zvýšením signálu příslušného píku (modrá). Měřeno druhým detekčním kanálem při $E_1=500$ mV.

6 Závěr

Tato bakalářská práce v teoretické části podává rozsáhlejší informace o oblíbené bylině ostropestřci mariánském. Cílem teoretické části bylo zpracovat biologicky aktivní látky obsažené v této bylině a podat informace o zásadních účincích na lidské zdraví, zejména hepatoprotektivní účinky. Z teoretické části dostává čtenář také základní vhled do doplňků stravy a jejich problematiky. Následně je podán výčet produktů z ostropestřce mariánského, které jsou dostupné na území České republiky. V závěru teoretické části je zpracován přehled metod, které se používají při analýze a charakterizaci ostropestřce mariánského.

V experimentální části byla nejprve studována elektroaktivita taxifolinu (dihydroquercetin) a silibininu pomocí cyklické voltametrie.

Dalším cílem byl vývoj HPLC metody pro současnou separaci taxifolinu a obou diastereoizomerů silibininu. V rámci optimalizace byl sledován vliv složení mobilní fáze, výběr kolony a upřednostnění selektivnějšího a citlivějšího elektrochemického detektoru před konvenčním UV-spektrofotometrickým detektorem.

V rámci řešení experimentální části byla nejprve vyvinuta jednoduchá, rychlá, isokratická HPLC metoda s elektrochemickou detekcí. Tato metoda byla poté aplikována na reálné vzorky tinktur, ve kterých byl identifikován taxifolin, silibinin A a silibinin B. Doba jedné analýzy nepřesáhla 25 minut. Jako vhodný pracovní potenciál pro detekci byl zvolen potenciál +100 mV pro taxifolin, resp. +500 mV pro silibinin. Tyto hodnoty byly zvoleny na základě změření hydrodynamických voltamogramů. Z nich mimo jiné vyplývá, že taxifolin se oxiduje snáze už při nízkém potenciálu.

V obou analyzovaných tinkturách (Naděje a Grešík) byly identifikovány látky taxifolin a silibinin na základě porovnávání retenčních dat se standardy a metodou spikování. Při srovnávání chromatogramů reálných vzorků se jednotlivé tinktury od sebe výrazně nelišily profilem obsahových látek, ačkoliv při výrobě tinktur byly použité různé části rostliny (semena, pupeny).

Vyvinutá HPLC-ED metoda je použitelná pro rutinní kontrolu obsahu studovaných látek v komerčních produktech z ostropestřce mariánského.

7 Seznam použitých zkratek

ED	elektrochemická detekce
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
LAKR	Léčivé aromatické a kořeninové rostliny
MF	mobilní fáze
NF- κ B	jaderný faktor kappa B
SZPI	Státní zemědělská a potravinová inspekce
UVA	ultrafialové záření

8 Zdroje

- [1] T. Mitáček, J. Neugebauerová, J. Prášil, I. Zadražilová, Pěstování léčivých a kořeninových rostlin v ekologickém zemědělství, 2. aktualizované vydání Bioinstitut, Olomouc 2014.
- [2] R. Croteau, T. M. Kutchan, N. G. Lewis, Natural products (Secondary metabolites), *Physiol. Mol. Biol. Plants* 24 (2000) 1250-1319.
- [3] MZe, O. r. k., Situační a výhledová zpráva: léčivé, aromatické a kořeninové rostliny. Ústav zemědělské ekonomiky a informací: 2020. Dostupné z: <https://eagri.cz/public/web/mze/zemedelstvi/roslinna-vyroba/roslinne-komodity/lecive-aromaticke-a-koreninove-rostliny/situacni-a-vyhledove-zpravy/>
- [4] <https://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/594-silybum-marianum-ostropestrec-mariansky>, staženo 15. dubna 2022.
- [5] B. Slavík, J. Štěpánková, J. Štěpánek, Květena České republiky, díl 7, Academia, Praha 2004.
- [6] I. Khan, H. U. Khattak, I. Ullah, F. K. Bangash, Study of the phytochemical properties of silybum marianum seed oil, *J. Chem. Society Pak.* 29 (2007) 545.
- [7] J. Bodlák, J.A. Zentich, Léčivá síla bodláků, Fontána, Olomouc 1995.
- [8] <https://www.topvet.cz/herbar/ostropestrec-mariansky>, staženo 9. dubna 2022
- [9] K. R. Ball, K. V. Kowdley, A review of Silybum marianum (milk thistle) as a treatment for alcoholic liver disease, *Journal of Clinical Gastroenterology* 39 (2005) 520-528.
- [10] <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=766>, staženo 9. dubna 2022.
- [11] M. Habán, P. Otepka, I. Šalamon, Poľnohospodárske aspekty pestovania liečivých rastlín, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Nitra 2008.
- [12] J. Moudrý, Z. Stražil, Pěstování alternativních plodin, první vyd., Jihočeská univerzita, České Budějovice 1999.
- [13] Databáze odrůd, dostupné z: <https://eagri.cz/public/app/sok/odrudyNouRL.do>
- [14] L. Abenavoli, R. Capasso, N. Milic, F. Capasso, Milk thistle in liver diseases: past, present, future, *Phytother. Res.* 24 (2010) 1423-1432.
- [15] T. P. Kondratyuk, J. M. Pezzuto, Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health, *Pharmaceutical Biology* 42 (2004) 46-63.

- [16] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, Polyphenols: food sources and bioavailability, *The American journal of clinical nutrition* 79 (2004) 727-747.
- [17] B. A. Graf, P. E. Milbury, J. B. Blumberg, Flavonols, flavonones, flavanones and human health: epidemiological evidence, *J Med Food* 8 (2005) 281- 290.
- [18] I. C. W. Arts, P. C. H. Hollman, Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies, *Am J Clin Nutr* (2005) 317-325.
- [19] L. Bravo, Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition Reviews* 56 (1998) 317–333.
- [20] P. G. Pietta, Flavonoids as antioxidants, *Journal of Natural Products* 63 (2000) 1035-1042
- [21] A. N. Panche, A. D. Diwan, S. R. Chandra, Flavonoids: an overview, *J Nutr Sci.* 5 (2016) 1-15.
- [22] L. H. Yao, Y. M. Jiang, J. Shi, Flavonoids in food and their health benefits, *Plant Foods Hum. Nutr.* 59 (2004) 113–122.
- [23] S. Kumar, A. K. Pandey., Chemistry and biological activities of flavonoids: an Overview. *Sci. World J* (2013).
- [24] S. F. AbouZid, H. S. Ahmed, A. S. Moawad, A. I. Owis, S. N. Chen, A. Nachtergaeel, J.B. McAlpine, J. B. Friesen, G F. Pauli, Chemotaxonomic and biosynthetic relationships between flavonolignans produced by *Silybum marianum* populations, *Fitoterapia* 119 (2017) 175-184.
- [25] A. Das, R. Baidya, T. Chakraborty, A. K. Samanta, S. Roy, Pharmacological basis and new insights of taxifolin: A comprehensive review, *Biomed. Pharmacother.* 142 (2021).
- [26] S. K. Das, S. Mukherjee, D. M. Vasudevan, Medicinal properties of milk thistle with special reference to silymarin—an overview, *Nat. Prod. Rad.* 7 (2008) 182-192.
- [27] D. Biedermann, E. Vavříková, L. Cvak, V. Křen, Chemistry of silybin, *Nat. Prod. Rep.* 31 (2014) 1138-1157.
- [28] C. S. Chambers, K. Valentová, V. Křen, "Non-taxifolin" derived flavonolignans: phytochemistry and biology, *Curr. Pharm. Des.* 21 (2015) 5489-5500.
- [29] S. AbouZid, O. M. Ahmed, Silymarin flavonolignans: structure–activity relationship and biosynthesis, *Stud. Nat. Prod. Chem. Elsevier* 40 (2013) 469-484.

- [30] P. M. Dewick, *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, England 2002.
- [31] J. Viktorová, S. Dobiasová, K. Řehořová, D. Biedermann, K. Káňová, K. Šeborová, Radka Václavíková, K. Valentová, T. Ruml, V. Křen, T. Macek, Antioxidant, anti-inflammatory, and multidrug resistance modulation activity of silychristin derivatives, *Antioxidants* 8 (2019) 303.
- [32] Z. Asghar, Z. Masood, Evaluation of antioxidant properties of silymarin and its potential to inhibit peroxy radicals in vitro. *Pak. J. Pharm. Sci.* 21 (2008) 249-254.
- [33] Z. Frassová, J. Rudá-Kučerová, Ostropestřec mariánský (*Silybum marianum*, L.) jako podpůrný fytotherapeutický prostředek v onkologii, *Klin. Onkol.* (2017) 426-432.
- [34] R. Agarwal, C. Agarwal, H. Ichikawa, R. P. Singh, B. B. Aggarwal, Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side, *Anticancer Res.* 26 (2006), 4457-4498.
- [35] A. Ghosh, T. Ghosh, S. Jain, Silymarin-a review on the pharmacodynamics and bioavailability enhancement approaches, *J. Pharm. Sci. Technol.* 2 (2010) 348-355.
- [36] P. Ferenci, B. Dragosics, H. Dittrich, H. Frank, L. Benda, H. Lochs, S. Meryn, W. Base, B. Schneider, Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver, *J. Hepatol.* (1989) 105-113.
- [37] E. Magliulo, B. Gagliardi, G. P. Fiori, Results of a double blind study on the effect of silymarin in the treatment of acute viral hepatitis, carried out at two medical centres (author's transl), *Medizinische klinik* 73 (1978) 1060-1065.
- [38] N. D. Freedman, T. M. Curto, C. Morishima, L. B. Seeff, Z. D. Goodman, E. C. Wright, R. Sinha, J. E. Everhart, Silymarin use and liver disease progression in the Hepatitis C Antiviral Long-Term Treatment against Cirrhosis trial, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 33 (2011) 127-137.
- [39] A. Kshirsagar, D. Ingawale, P. Ashok, N. Vyawaharph. Silymarin: A comprehensive review, *Pharmacogn. Rev.* 3 (2009) 126-134.
- [40] E. Kieslichová, Intoxikace muchomůrkou zelenou: mechanismus toxicity, klinické projevy a terapeutické postupy, *Vnitr. Lek.* 67 (2021) E13-E17.
- [41] Fáze jaterního onemocnění, <https://blog.ucbmsh.org/principal/liver-cirrhosis-2>, staženo 9. dubna 2022.

- [42] T. Hosseinabadi, Z. Lorigooini, M. Tabar zad, B. Salehi, C. F. Rodrigues, N. Martins, J. Sharifi-Rad, Silymarin antiproliferative and apoptotic effects: insights into its clinical impact in various types of cancer, *Phytother. Res.* 33 (2019) 2849-2861.
- [43] A. Svobodová, A. Zdařilová, J. Malisková, H. Mikulková, D. Walterová, J. Vostalová, Attenuation of UVA-induced damage to human keratinocytes by silymarin, *J. Dermatol. Sci.* 46 (2007) 21-30.
- [44] R. Capasso, G. Aviello, F. Capasso, F. Savino, A. A. Izzo, F. Lembo, F. Borrelli, Silymarin BIO-C®, an extract from *Silybum marianum* fruits, induces hyperprolactinemia in intact female rats, *Phytomedicine* 16 (2009) 839-844.
- [45] V. Soleimani, P. S. Delghandi, S. A. Moallem, G. Karimi, Safety and toxicity of silymarin, the major constituent of milk thistle extract: An updated review, *Phytother. Res.* 33 (2019) 1627-1638.
- [46] Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů.
- [47] Rozlišení doplňků stravy od léčivých přípravků, dostupné z: <https://www.sukl.cz/leciva/rozliseni-doplunku-stravy-od-lecivych-pripravku>
- [48] <https://www.freshtime.cz/2021/12/doplunky-stravy-uzivaji-tri-ctvrtiny-cechu-mezi-vitaminy-vede-c-a-d-mineralnim-latkam-kraluje-horcik/>
- [49] J. Fibigr, D. Šatínský, P. Solich, Current trends in the analysis and quality control of food supplements based on plant extracts, *Anal. Chim. Acta* 1036 (2018) 1-15.
- [50] J. Fibigr, Využití HPLC techniky v analýze doplňků stravy na bázi rostlinných extraktů, disertační práce, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2019.
- [51] M. Fenclová, A. Novaková, J. Viktorová, P. Jonátová, Z. Džuman, T. Ruml, V. Křen, J. Hajšlová, L. Vítek, M. Stranská-Zachariášová, Poor chemical and microbiological quality of the commercial milk thistle-based dietary supplements may account for their reported unsatisfactory and non-reproducible clinical outcomes, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1-12.
- [52] Přednáška doc. Ing. Mileny Stránské Ph.D. (VŠCHT Praha): „Možnosti moderní analytické chemie v kontrole kvality a bezpečnosti potravin a doplňků stravy.“ V Olomouci dne 21. 10. 2021
- [53] R. Boško, M. Pernica, S. Běláková, M. Bjelková, H. Pluháčková, Determination of T-2 and HT-2 Toxins in Seed of Milk Thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] Using Immunoaffinity Column by UPLC-MS/MS, *Toxins* 14 (2022) 258.

- [54] Z. Nováčková, *Zázračné byliny aneb k dlouhověkosti bez léků*, BVD s.r. o., Praha 2018.
- [55] G. Olšanská, *Přehled o nejčastěji využívaných druzích Léčivých rostlin pěstovaných a sbíraných na území ČR*, dostupné z: <https://www.pelero-cz.cz/fotogalerie/>
- [56] *Ostropestřec mariánský*, dostupné z: <https://www.grizly.cz/grizly-ostropestrec-mariansky-bio-500-g>
- [57] P. Kidd, K. Head, A review of the bioavailability and clinical efficacy of milk thistle phytosome: a silybin-phosphatidylcholine complex (Siliphos), *Altern. Med. Rev.* 10 (2005) 193-203.
- [58] M. Padma, S. Ganesan, T. Jayaseelan, S. Azhagumadhavan, P. Sasikala, S. Senthilkumar, P. Mani, Phytochemical screening and GC–MS analysis of bioactive compounds present in ethanolic leaves extract of *Silybum marianum* (L.), *J. Drug. Deliv. Ther.* 9 (2019) 90-94.
- [59] T. Mpanza, M. I. Sabela, S. S. Mathenjwa, S. Kanchi, K. Bisetty, Electrochemical determination of capsaicin and silymarin using a glassy carbon electrode modified by gold nanoparticle decorated multiwalled carbon nanotubes, *Analytical Letters* 47 (2014) 2813-2828.
- [60] E. M. Hassan, E. F. Khamis, I. Eman, M. A. Barary, Development of a differential pulse voltammetric method for the determination of Silymarin/Vitamin E acetate mixture in pharmaceuticals, *Talanta*, 74 (2008) 773-778.
- [61] E. M. Hassan, E. F. Khamis, I. Eman, M. A. Barary, Development of a differential pulse voltammetric method for the determination of Silymarin/Vitamin E acetate mixture in pharmaceuticals, *Talanta*, 74 (2008) 773-778.
- [62] A. Cheilari, S. Sturm, D. Intelmann, C. Seger, H. Stuppner, Head-to-Head Comparison of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection versus Quantitative Nuclear Magnetic Resonance for the Quantitative Analysis of the Silymarin Complex in *Silybum marianum* Fruit Extracts, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 1618-1626.
- [63] D. Gad, H. El-Shora, D. Fraternali, E. Maricchiolo, A. Pompa, K.-J. Dietz, Bioconversion of Callus-Produced Precursors to Silymarin Derivatives in *Silybum marianum* Leaves for the Production of Bioactive Compounds, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 2149.

- [64] D. Ionescu, S. Spînu, A. Ortan, I. Moraru, G. Fîntîneru, R. Fierăscu, I. Fierăscu, M. Drugulescu, Evaluation of biological active compounds found in *Silybi mariani fructus*, *AgroLife Sci. J.* 6 (2017) 141-145.
- [65] R. A. Minakhmetov, L. A. Onuchak, V. A. Kurkin, E. V. Avdeeva, A. V. Volotsueva, Analysis of Flavonoids in *Silybum marianum* Fruit by HPLC, *Chem. Nat. Compd.* 37 (2001) 318-321.
- [66] T. N. Graf, N. B. Cech, S. J. Polyak, N. H. Oberlies, A validated UHPLC-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of flavonolignans in milk thistle (*Silybum marianum*) extracts, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (2016) 126-133.
- [67] S. Tavakoli, F. Khalighi-Sigaroodi, R. Hagiaghaee, M. Yaghoobi, R. Ghafarzadegan, Purification, identification, and standardization of silybin A & B composition from *Silybum marianum* (L.) Gaertn., *J. Med. Plants* 81 (2022) 1-11.
- [68] S. F. AbouZid, S.-N. Chen, J. B. McAlpine, J. B. Friesen, G. F. Pauli, *Silybum marianum* pericarp yields enhanced silymarin products, *Fitoterapia* 112 (2016) 136-142.
- [69] F. Kvasnička, B. Bíba, R. Ševčík, M. Voldřich, J. Krátká, Analysis of the active components of silymarin, *J. Chromatogr. A.* 990 (2003) 239-245.
- [70] T. Ding, S. Tian, Z. Zhang, D. Gu, Y. Chen, Y. Shi, Z. Sun, Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2001) 155-161.