

most to antioxidant activity. In the hawthorn fruit tincture it was epicatechine and hyperosid, whereas in the motherwort herb tincture it was rutin.

Key words: *Crataegi fructus* – *Leonuri herba* – tinctures – flavonoids – antioxidant activity

Čes. slov. Farm., 2008; 57, 35–38

Má

Úvod

Mezi faktory, kterým je v současnosti připisován stále větší význam v rozvoji patologických procesů v organismu, patří volné radikály. Tyto částice vznikají jako vedlejší produkty buněčného metabolismu a představují vysoce reaktivní formy kyslíku a dusíku, velmi rychle interferující s vhodnou biologickou strukturou (např. DNA, lipidy či proteiny)¹⁾. Taková reakce pak často vede k dočasnému nebo trvalému poškození biomolekul²⁾.

Volné radikály hrají klíčovou úlohu při vzniku a rozvoji kardiovaskulárních a nádorových onemocnění, zánětlivých procesů, cukrovky, neurodegenerativních poškození, urychlují rovněž stárnutí organismu^{3–7)}. Protože vznikají jako přirozený produkt buněčného metabolismu, je za normálních okolností každá buňka vybavena specifickými mechanismy, které ji chrání před těmito reaktivními částicemi¹⁾. Takový systém tvoří některé enzymy (superoxiddismutasa, katalasa, glutathionperoxidasa), proteiny a další látky (glutathion, α -tokoferol, kyselina askorbová aj.)^{8, 9)}. Při porušení obranných mechanismů může dlouhodobě docházet k poškození buněčných struktur.

Účinnou zbraní proti negativnímu působení reaktivních forem kyslíku a dusíku jsou látky s antioxidantním účinkem – antioxidanty, jako jsou vitaminy, enzymy, stopové prvky (Se, Zn, Cu) a látky rostlinného původu^{6, 10, 11)}. Mezi antioxidanty rostlinného původu patří polyfenoly, zejména flavonoidy, které mohou vykazovat celou řadu dalších biologických aktivit, např. antikancerogenní, imunostimulační, antialergické, protizánětlivé, antibakteriální a další^{3, 11)}. Proto některé fytopreparáty současně s hlavním farmakologickým efektem zvyšují ochranu organismu proti následkům oxidačního stresu.

K tradičním léčivým rostlinám ovlivňujícím kardiovaskulární systém se řadí hloh jednosemenný (*Crataegus monogyna* Jacq.) nebo obecný (*Crataegus laevigata* (Poir.) Dc.) z čeledi růžovitých (*Rosaceae*)^{12, 13)}. Jako droga se používá květ (*Crataegi flos*), list s květem (*Crataegi folium cum flore*) nebo plod (*Crataegi fructus*). Z těchto drog se ve světě vyrábí celá řada fytopreparátů, které se uplatňují jako hypotonika, kardiotonika, anti-sklerotika, sedativa, spazmolytika či diuretika¹⁴⁾. Převážnou část účinných látek v droze tvoří flavonoidy, triterpenové kyseliny, puriny a některé další látky^{14–16)}, u nichž byl v literatuře popsán antioxidantní efekt^{16, 17)}.

Mnohem méně prozkoumanou rostlinou, rovněž charakteristickou kardiovaskulárním působením, je srdečník obecný (*Leonurus cardiaca* L.) z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*), u něhož jako droga slouží nať (*Leonuri herba*). Přípravky z nati srdečníku mají účinek kardiotonický, hypotonický, sedativní, spazmolytický a diuretický¹⁸⁾.

Droga obsahuje glykosidy, flavonoidy, labdanové diterpeny, saponiny, některé organické kyseliny a další látky^{19, 20)}.

Litevské farmaceutické podniky vyrábějí tinktury z hlohových plodů a nati srdečníku, které slouží jako podpůrná léčba ve výše zmíněných indikacích, proto je studium antioxidantní aktivity těchto přípravků v současné době aktuální.

Cílem práce bylo stanovení antioxidantní aktivity uvedených tinktur a rovněž hodnocení vlivu vybraných obsahových látek na antioxidantní aktivitu tinktur.

POKUSNÁ ČÁST

Materiál

Hlohové plody (*Crataegi fructus*) a nať srdečníku (*Leonuri herba*) poskytl Kaunasská botanická zahrada Univerzity Vytautase Velikého. Drogy splňovaly požadavky Evropského lékopisu. Ze zmíněných drog byly klasickou perkolací připraveny tinktury v poměru 1:5, kde jako vyluhovač sloužil ethanol 50% (tinktura z hlohových plodů) nebo ethanol 70% (tinktura z nati srdečníku). Látky k přípravě standardů (rutin, kvercetin, hyperosid, epikatechin, procyanidin B2) dodala firma UAB „Grida LAB“ (Litva).

Ke stanovení fenolických sloučenin a antioxidantní aktivity byly použity chemikálie: tyrosin (BDH Chemicals, 3-nitrotyrosin (Aldrich), DPPH (Sigma), Folin-Ciocalteuovo činidlo a kyselina galová (Fluka). Další pro experiment potřebné chemikálie byly běžně komerčně dostupné. Roztok peroxynitritu byl připraven podle metody popsané v literatuře²¹⁾.

Metodika

Stanovení flavonoidů HPLC²²⁾

K těmto účelům sloužil chromatografický systém Waters 2690 (detektor UV Waters 2487, kolona X-terra RP18 3,0 × 150 mm, velikost částic sorbentu 3,5 μ m). Složení mobilní fáze bylo 0,1% vodný roztok kyseliny trifluoroctové (A) a 0,1% roztok kyseliny trifluoroctové v acetonitrilu (B). Změny gradientu: od 5 % (B) do 45 % (B) za 45 min. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min. Pro chromatografickou analýzu byly vybrány vlnové délky 360 nm a 275 nm. Množství flavonoidů bylo vypočítáno z kalibračních grafů na základě plochy píku.

Stanovení fenolických sloučenin

Celkový obsah fenolů byl stanoven pomocí kolorimetrické metody²³⁾; 700 μ l vodou naředěné tinktury bylo oxidováno Folin-Ciocalteuovým činidlem (400 μ l) a poté byla reakční směs doplněna do 10,0 ml roztokem uhlíčitane sodného (75 g/l). Po 2 hodinách byla suspenze odstředěna (10 min při 5000 ot./min) a 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 tinktury.

Ke stanovení antioxidační aktivity sloužily dvě metody. Byla měřena inhibice peroxynitritem indukované nitrace tyrosinu^{21, 24)} a schopnost zhášet radikály byla sledována pomocí stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH)^{25, 26)}. Zjišťovala se antioxidační aktivita samotných tinktur a rovněž antioxidační aktivita vybraných flavonoidů (rutin, kvercetin, hyperozid, epikatechin, procyanidin B2). Koncentrace uvedených sloučenin ve zkoumaných roztocích (standardech) byly totožné s koncentracemi daných látek v tinkturách.

Inhibice nitrace tyrosinu

K měření sloužil kapalinový chromatograf HP 1100 (Agilent Technologies) obsahující 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 kyselina mravenčí a acetonitril (90:10, v/v) isokraticky při průtoku 1 ml/min. Samotné měření proběhlo následujícím způsobem: roztok 2,0 mM peroxynitritu (8 µl) v 0,05 M NaOH byl nabrán a smíchán v injektoru HPLC s 1,0 mM roztokem tyrosinu a vhodně naředěnou tinkturou či standardem v 0,11 M fosfátovém pufru (42 µl). Reakční směs byla injektována přímo na kolonu HPLC, chromatogramy byly detekovány při 276 nm. Inhibice nitrace tyrosinu byla vypočítána relativně ke zjištěné ploše píku 3-nitrotyrosinu v kontrolním měření.

Redukce DPPH

Odpovídající množství tinktury nebo standardu bylo doplněno 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.

Výsledky experimentu byly zpracovány statisticky s použitím Studentova testu ($p < 0,05$).

VÝSLEDKY A DISKUZE

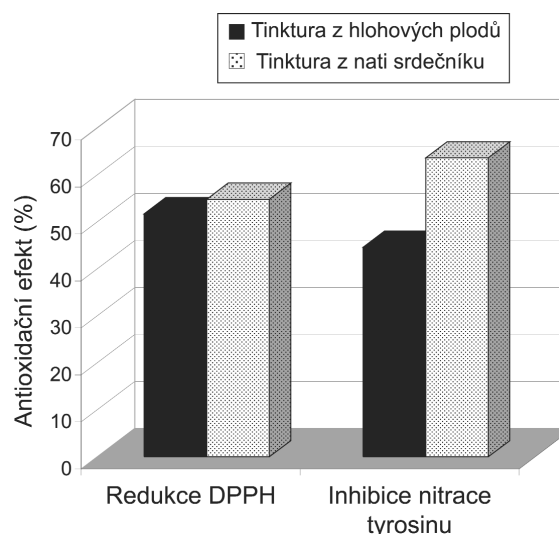
Stanovení celkového obsahu fenolických látek ukázalo, že tinktura z nati srdečníku obsahuje výrazně více těchto sloučenin nežli tinktura z hlohových plodů – 227 mg/100 ml oproti 139 mg /100 ml (tab. 1). HPLC analýza prokázala, že ze zkoumaných látek převažuje v tinktuře z nati srdečníku rutin (54,91 µg/ml) a v tinktuře z hlohových plodů hyperozid (29,32 µg/ml) a epikatechin (44,92 µg/ml).

Obě zkoumané tinktury byly schopné zhášet radikály a reaktivní formy kyslíku a dusíku. Účinnější byla tinktura z nati srdečníku, avšak rozdíl nebyl tak výrazný jako v případě fenolických sloučenin. Celkový obsah polyfenolů byl v tinktuře z nati srdečníku o 163 % větší, přesto antiperoxynitritová aktivita byla vyšší jen o 19 % ($p < 0,05$), a schopnost redukce DPPH se u obou tinktur lišila minimálně (54,8 % u tinktury z nati srdečníku a 51,7 % u tinktury z hlohových plodů) (obr. 1). V četných literárních zdrojích se uvádí, že se na antioxidační aktivitě rostlinných přípravků významným způsobem podílejí fenolické sloučeniny^{3, 27, 28)}. Vyskytují se však i práce, kde se přímý vliv fenolických sloučenin u některých rostlin nepotvrdil²⁹⁾. V naší předchozí práci³⁰⁾ se rovněž zjistilo, že přesto, že množství fenolických slou-

Tab. 1. Množství sledovaných látek v tinkturách

	Tinktura z hlohových plodů	tinktura z nati srdečníku
celkový obsah polyfenolů (GAE mg/100 ml)	139 ± 8	227 ± 14*
množství jednotlivých flavonoidů (µg/ml)		
rutin	2,64 ± 0,2	54,91 ± 1,2*
hyperozid	29,12 ± 0,5	14,07 ± 0,7
kvercetin	1,26 ± 0,1	6,70 ± 0,4
epikatechin	44,92 ± 0,9	–

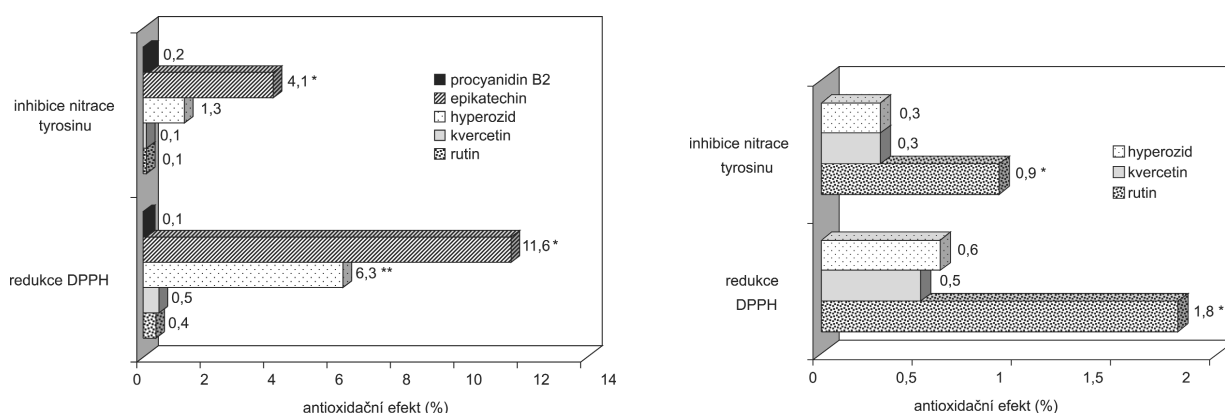
* $p < 0,05$ ve srovnání s tinkturou z hlohových plodů



Obr. 1. Antioxidační aktivita tinktur

čenin bylo v tinktuře z jinanu dvoulaločného statisticky významně vyšší, antioxidační aktivita této tinktury byla slabší než tinktur připravených ze zázvorových oddenků či nati třapatky nachové. Lze předpokládat, že i v případě zkoumaných tinktur, zejména tinktury z hlohových plodů, budou antioxidační aktivitu ovlivňovat další účinné látky, nebo že aktivita některých fenolických sloučenin, zjištěných v tinktuře z nati srdečníku, bude prakticky bezvýznamná.

V dalších experimentech bylo naší snahou zjistit, jak se na antioxidační aktivitě podílejí vybrané flavonoidy přítomné ve zkoumaných tinkturách. Výsledky ilustruje obrázek 2. Celkově největší podíl měly látky přítomné v tinkturách ve vyšších koncentracích. V tinktuře z hlohových plodů to byly epikatechin a hyperozid (obr. 2A). Další látky se podílely na antioxidační aktivitě tinktury menší mírou, což odpovídá jejich relativně nízkým koncentracím. Zajímavá však je poměrně výrazná antiperoxynitritová aktivita procyanidinu B2 – byla větší než u rutinu a kvercetinu přítomných v tinktuře ve vyšších koncentracích. Ve vztahu k epikatechinu a hyperozidu byla rovněž, vzhledem ke koncentraci, antiperoxynitritová aktivita vyšší – koncentrace epikatechinu byla v tinktuře 63× a hyperozidu 42× vyšší, kdežto aktivita byla vyšší jen 20 resp. 6,5×. Zjištění, že procyanidin vykazuje větší aktivitu než vybrané flavonoidy, souhlasí



Obr. 2. Vliv vybraných flavonoidů na antioxidační aktivitu tinktur
A. Tinktura z hlohových plodů; B. Tinktura z nati srdečníku

** $p < 0,05$ ve srovnání s ostatními flavonidy

** $p < 0,05$ ve srovnání s procyanidinem B2, quercetinem a rutinem

s výsledky naší předchozí práce ²⁴⁾ a poznatky některých dalších autorů ³¹⁾.

V tinktuře z nati srdečníku celkovou antioxidační aktivitu nejvíce ovlivňoval rutin, jehož koncentrace v tinktuře byla rovněž nejvyšší (obr. 2B). Přesto tento vliv nebyl přímo úměrný koncentraci. Koncentrace rutinu byla oproti kvercetinu osminásobná, kdežto antioxidační aktivita jen trojnásobná. Nižší účinnost rutinu byla rovněž prokázána v tinktuře z hlohových plodů, kde při vyšší koncentraci rutinu (2,64 $\mu\text{g/ml}$ oproti 1,26 $\mu\text{g/ml}$) byla procentuálně vyjádřená antioxidační aktivita kvercetinu větší.

ZÁVĚR

V literatuře se vyskytují četné odkazy na pozitivní účinek fenolických sloučenin a vybraných flavonoidů na různé systémy organismu ^{32, 33)}. Tyto látky jsou důležité v léčbě a prevenci různých onemocnění včetně kardiovaskulárních. Výsledky naší práce prokázaly, že tinktury z hlohových plodů a nati srdečníku, stejně jako v nich přítomné účinné látky, mají výraznou antioxidační aktivitu, proto užívání těchto tinktur může být prospěšné nejen z hlediska podpůrné léčby kardiovaskulárních onemocnění, ale i ke zmírnění negativních účinků oxidačního stresu.

LITERATURA

- Halliwell, B. et al.: Food Chem. Toxicol., 1995; 33(7), 601–617.
- Citoğlu, G. S. et al.: J. Ethnopharmacol., 2004; 92, 275–280.
- Cai, Y. et al.: Life Sci., 2004; 74, 2157–2184.
- El Naggar, E. B. et al.: Acta Vet. Brno, 2005; 74, 347–352.
- Simone, C. B. et al.: J. Alter. Ther. Health Med., 2007, 13(1), 22–28.
- Balaraman, R., Bafna, P. A., Kolhapure, S. A.: J. Ethnopharmacol., 2004; 94, 135–141.
- Vetický, D., Ceral, J.: Neurologie pro praxi, 2005; 4, 218–220.
- Pieta, P.-G. J.: Nat. Prod., 2000; 63, 1035–1042.
- Kolečkář, V. et al.: Čes. slov. Farm., 2007; 56, 73–76.
- Cornelli, U. et al.: J. Nutr., 2001; 131, 3208–3211.
- Aguay, D. et al.: Burns, 2005; 31(3), 366–371.
- Rigelsky, J. M., Sečet, B. V.: Am. J. Health Syst. Pharm., 2002, 59, 417–422.
- Daniele, C. et al.: Drug safety, 2006, 29(6), 523–535.
- WHO monograph of selected medicinal plants. Vol. 2. Ženeva, WHO, 2001, s. 66.
- Vierling, W. et al.: Phytomedicine, 2003; 10, 8–16.
- Zhang, Z. Z. et al.: J. Nutr. Biochem., 2001; 12, 144–152.
- Yoo, K. M. et al.: Food Chem., 2008, 106, 929–936.
- Milkowska-Leyck, K., Filipek, B., Strzelecka, H. J.: Ethnopharmacol., 2002; 80, 85–90.
- Ali, M. S. et al.: Phytother. Res., 2007; 21, 558–561.
- Matkowski, A., Piotrowska, M.: Fitoterapia, 2006, 77, 346–353.
- Muselík, J., Hytych, P., Žemlička, M.: Čes. slov. Farm., 2005; 54, 114–117.
- Merken, H. M., Beecher, G. R.: J. Agric. Food Chem., 2000; 48, 577–599.
- Middleton, E., Kandaswami, C.: Biochem. Pharmacol., 1992; 43(6), 1167–1179.
- Muselík, J. et al.: Int. J. Mol. Sci., 2007; 8, 797–809.
- Lee, J. Y., Hwang, W.-I., Lim, S.-T.: J. Ethnopharmacol., 2004; 93, 409–415.
- Huang, A., Ou, B., Prior, R. L.: J. Agric. Food Chem., 2005; 53, 1841–1856.
- Pellati, F. et al.: J. Pharm. Biomed. Anal., 2004; 35, 289–301.
- Fenglin, H. et al.: Fitoterapia, 2004; 75, 14–23.
- Bozan, B., Karakaplan, U.: Acta Aliment., 2007; 36 (3), 321–328.
- Masteiková, R. et al.: Medicina, 2007; 43(4), 306–309.
- Soobrattee, M. A. et al.: Mutation Res., 2005; 579, 200–213.
- Havsteen, B. H.: Pharmacol. Ther., 2002; 96(2–3), 67–202.
- Lee, K. W., Lee, H. J.: Biofactors, 2006; 26(2), 105–121.

SOUHRNÝ PŘEDNÁŠEK

POKROKY V LÉKOVÝCH FORMÁCH – PRACOVNÍ DEN SEKCE TECHNOLOGIE LÉKŮ ČFS JEP

Praha, 15. ledna 2008

Pracovní den Sekce technologie léků České farmaceutické společnosti „Pokroky v lékových formách“ se konal 15. ledna 2008 v přednáškovém sále Lékařského domu v Praze. Příspěvky s aktuální problematikou prezentovalo deset zástupců několika autorských kolektivů z akademických pracovišť (Farmaceutická fakulta VFU Brno, Farmaceutická fakulta UK Hradec Králové, Farmaceutická fakulta UK Bratislava, IPVZ Praha, VŠCHT Praha), výzkumného ústavu (VÚ veterinárního lékařství v Brně) a farmaceutického průmyslu (Zentiva a.s. Praha a Hlohovec). Přednášky se zaměřily na novinky v lékových formách pro parenterální, perorální, orální i transdermální aplikaci, jejich pomocné látky, technologie a jakostní parametry.

Moderní lékové formy byly zastoupeny lipozomy, mikrobublinami, mikročásticemi a mukoadhezivními přípravky. Posluchači se seznámili také s novinkami u lékových forem, které si již vydobily svou pevnou pozici v současné farmakoterapii, jako jsou radiofarmaka, transdermální terapeutické náplasti, perorální matricové a peletové léčivé přípravky. Nové a inovované typy pomocných látek zastupovala oxycelulosa. Zajímavým příspěvkem byly některé nové aspekty v technologii přípravy a podávání totální parenterální výživy u dětí. Matematické modelování technologických procesů přímého lisování, granulace a jejich parametrů v laboratorním a provozním měřítku přispělo k novému pohledu na tuto oblast farmaceutické technologie; možnost automatického přenosu laboratorních do provozních šarží má zásadní význam a ekonomický dopad na farmaceutický průmysl.

Pracovního dne se zúčastnilo přibližně 70 odborníků z veřejných a nemocničních lékáren, Státního ústavu pro kontrolu léčiv, farmaceutického průmyslu a univerzitních pracovišť.

Pracovní den Sekce technologie léků proběhl za podpory společnosti ZENTIVA, které patří naše poděkování.

*doc. PharmDr. Miloslava Rabišková, CSc.
Ústav technologie léků FaF, VFU Brno
e-mail: rabiskovam@vfu.cz*

IMPLANTÁTY JAKO LÉKOVÉ TRANSPORTNÍ SYSTÉMY

MASTEIKOVÁ R.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta,
Ústav technologie léků
e-mail: masteikovar@vfu.cz

Implantáty představují významnou skupinu přípravků umožňujících cílený transport léčiv. Zavádějí se do organismu parenterální cestou, čímž se vyloučí negativní působení gastrointestinálního traktu, a léčivo se dostává přímo na místo působení či do systémového krevního oběhu. U implantátů s místním působením se tímto docílí přesného dávkování při menší spotřebě léčiva, nižšího výskytu nežádoucích systémových účinků a dodání léčiva na místa jinými způsoby obtížně dosažitelná. Hlavní výhoda implantátů určených pro systémové působení tkví v prodlouženém, kontinuálním, popř. řízeném uvolňování léčiva. Doba, na kterou je implantát do lidského těla zaveden, se počítá na měsíce až roky. Tím se výrazně zvyšuje compliance pacienta a v řadě případů implantáty umožňují podávat

léčivo pacientům nespolupracujícím či léčbu odmítajícím.

Z hlediska způsobu inkorporace léčiva a konstrukce implantátu mohou mít implantáty charakter matricový nebo zásobníkový. Mezi novější systémy patří implantáty vznikající *in situ* v organismu po aplikaci kapalného nebo polotuhého přípravku.

V současné době se implantáty s léčivem používají v klinické praxi v následujících oblastech:

- hormonální antikoncepce,
- hormonální substituční terapie a léčba hormonálních poruch,
- terapie nádorových onemocnění,
- koronární angioplastika – stenty uvolňující léčivo,
- léčba závislostí,
- oftalmologie – léčba cytomegalovirové retinitidy a neinfekční uveitidy,
- ortopedie – prevence infekcí po ortopedických operacích,
- terapie bolesti – implantovatelné pumpy,
- terapie cukrovky – implantovatelné pumpy.