

CHARAKTERIZACE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V ŘEPÍKU LÉKAŘSKÉM

*Nové pohledy na analytickou chemii**

ANNA LOUČKOVÁ, KAMILA HŮRKOVÁ a JANA HAJŠLOVÁ

*Ústav analýzy potravin a výživy, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
louckova@vscht.cz*

Došlo 17.5.21, přijato 24.5.21.

Klíčová slova: řepík lékařský, UHPLC-HRMS/MS, profil biologicky aktivních látek

Úvod

Řepík lékařský (*Agrimonia eupatoria*) je vytrvalá bylina z čeledi růžovitých (*Rosaceae*), která obsahuje velké množství biologicky aktivních sloučenin. Jde o sekundární metabolity ze skupiny polyfenolů, především taniny, jejich obsah v sušině dosahuje až 11 %, flavonoidy, kterých obsahuje kolem 1,9 % a fenolové kyseliny^{1,2}.

Řepík je od nepaměti využíván v tradiční medicíně pro své široké spektrum léčivých účinků. I dnes se pro své terapeutické účinky a nízkou toxicitu využívá v medicíně pro přípravu léčivých přípravků, volně v prodeji jsou směsi na přípravu čajů či oplachů pokožky. Pro tyto účely je využívána nať řepíku, a to především pro svůj protizánětlivý účinek. Má díky němu pozitivní efekt na hojení chronických ran, jeho mechanismus ale není dosud detailně popsán^{3,4}. Pro medicínské účely se používají různé připravené extrakty řepíku lékařského. Zastoupení biologicky aktivních složek v daném extraktu samozřejmě závisí na použitém extrakčním činidle. V tradiční medicíně se používají extrakty vodné ve formě odvarů či výluhů, extrakty ethanolové nebo extrakty ve směsi vody a ethanolu, takzvané tinktury⁴⁻⁶.

Cílem této práce je srovnání profilu biologicky aktivních látek obsažených ve vodných extraktech řepíku lékařského připravených alternativními postupy, buď jako odvar nebo výluh, pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišující tandemovou hmotnost-

ní spektrometrií (UHPLC-HRMS/MS) umožňující sledovat rozdíly v obsahu bioaktivních látek.

Experimentální část

Příprava vzorků

Sušená nať řepíku lékařského pocházela z tržní sítě (Byliny Mikeš s.r.o.). Pro přípravu extraktů bylo použito 18 g sušené nati a 1 litr deionizované vody (přečištěná z destilované vody pomocí zařízení Milli-Q, Millipore). V rámci přípravy výluhu byl řepík zalit jedním litrem vroucí vody a 15 min louhován, při přípravě odvaru byl vsypán do litru vroucí vody a 10 min povařen. Extrakty byly zfiltrány přes filtrační papír a alikvotní podíly převedeny do 2ml vialky pro analýzu.

Instrumentální analýza

K UHPLC-HRMS/MS analýze byl využit kapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 (Thermo) s kolonou HSS T3 (2,1×100 mm, velikost částic 1,8 μm) (Waters). Teplota kolony byla 40 °C, objem nástřiku 2 μl. Pro přípravu mobilních fází byl využit mravenčan amonný (čistota 99 %, Sigma-Aldrich), methanol (Honeywell Riedel-de Haën™), mravenčí kyselina (čistota 98 %, Sigma-Aldrich) a deionizovaná voda (Milli-Q, Millipore). Složky mobilní fáze byly následující: A: 5mM mravenčan amonný ve vodě s příměsí 0,1 % mravenčí kyseliny, B: 5mM mravenčan amonný v methanolu s příměsí mravenčí kyseliny. Gradientová eluce začínala v 1. minutě na 95 % vodné složky a 5 % organické složky mobilní fáze, od 8. do 13. minuty byl poměr nastaven na 100 % organické složky



Anna Loučková úspěšně obhájila svou diplomovou práci zaměřenou na problematiku sledování biologicky aktivních látek v léčivých rostlinách vypracovanou na Ústavu analýzy potravin a výživy na Fakultě potravinářské a biochemické technologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze.

Anna Loučková získala 2. místo v celostátní soutěži o nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie „O cenu Karla Štulíka 2021“.

a od 13. do 15. minuty byl poměr znovu 95 % vodné a 5 % organické složky.

Hmotnostní detekce byla provedena na přístroji TripleTOF™ 6600 (SCIEX) s hybridním hmotnostním analyzátozem typu Q-TOF (kvadrupól ve spojení s analyzátozem doby letu). Použita byla ionizace elektrospřejem v pozitivním i negativním módu ionizace. Parametry pozitivní ionizace byly: teplota iontového zdroje 500 °C, napětí na kapiláře +5000 V. Parametry negativní ionizace byly: teplota iontového zdroje 450 °C a napětí na kapiláře –4000 V. Kolizní energie byla 35 eV (+/– 15 eV) a rozsah snímaných hodnot m/z byl 100–1200.

Pro vyhodnocení naměřených dat byl použit program PeakView v.2.2 s funkcí MasterView (SCIEX).

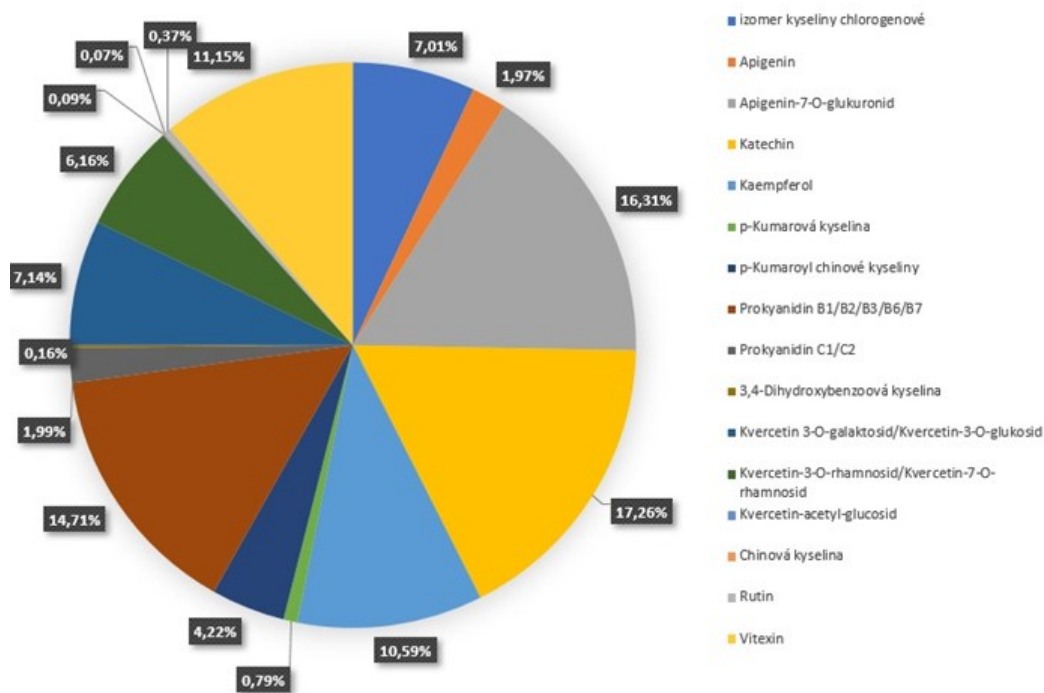
Výsledky a diskuse

U obou extraktů byl proveden cílový screening látek. Dle literatury byla vytvořena databáze biologicky aktivních sloučenin vyskytujících se v řepíku lékařském, která obsahovala sumární vzorce, resp. elementární složení, teoretické přesné hodnoty protonovaných i deprotonovaných molekulových iontů 37 látek ze skupiny taninů, flavo-

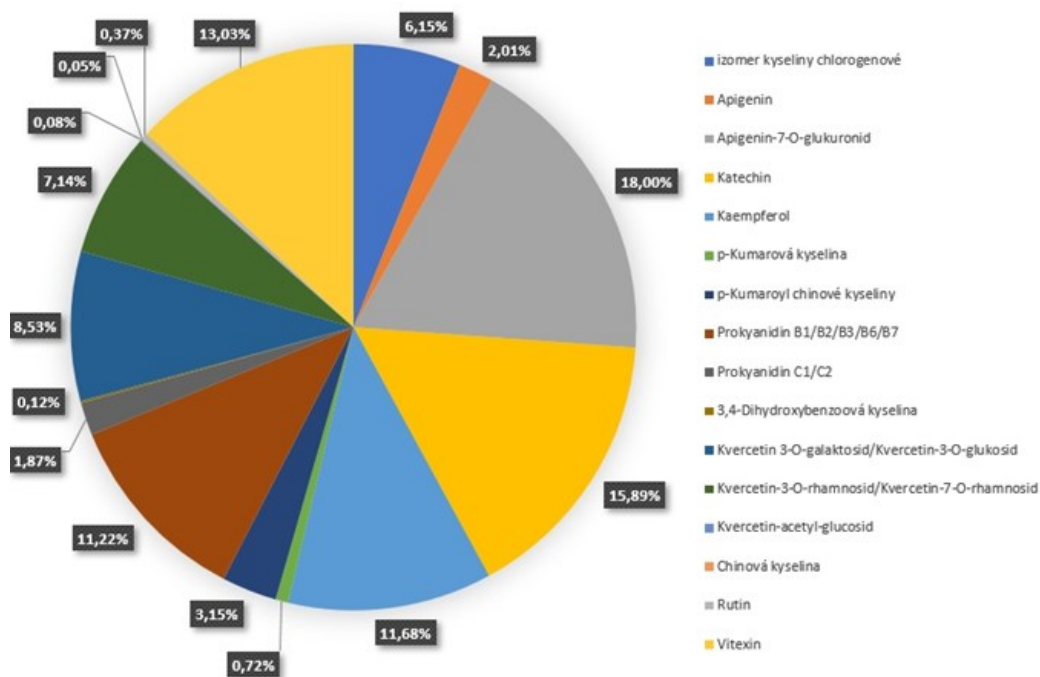
Tabulka I

Přehled identifikovaných sloučenin v obou extraktech řepíku lékařského, jejich retenčních časů a nalezených hmotnostních fragmentů z pozitivního a negativního módu ionizace

| Sloučenina | Sumární vzorec | Retenční čas [min] | [M+H] ⁺ | | [M-H] ⁻ | |
|---|---|--------------------|--|-----------------------------------|--|-------------------------|
| | | | protonovaný molekulární iont [m/z] | fragmenty [m/z] | deprotonovaný molekulární iont [m/z] | fragmenty [m/z] |
| Isomer chlorogenové kyseliny | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 3,25 | 355,1023 | 135,179,191 | 353,0878 | 135, 179, 191 |
| Apigenin | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | 5,58 | 271,0601 | 153, 271 | 269, 0455 | – |
| Apigenin-7- <i>O</i> -glukuronid | C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁ | 5,58 | 447,0921 | 153, 271 | 445,0776 | – |
| Katechin | C ₁₅ H ₁₄ O ₆ | 4,41 | 291,0863 | 123, 139,165 | 289,0717 | 109, 123, |
| Kaempferol | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ | 5,81 | 287,0550 | 153, 165, | 285,0405 | 108, 151 |
| <i>p</i> -Kumarová kyselina | C ₉ H ₈ O ₃ | 3,47 | 165,0564 | 91, 119, 147 | 163,0400 | – |
| <i>p</i> -Kumaroyl chinové | C ₁₆ H ₁₈ O ₈ | 3,15 | 339,1074 | – | 337,0929 | 163, 191 |
| Prokyanidin B1/B2/B3/B6/B7 | C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ | 3,52 | 579,1497 | 123, 127, 139, 163, 275, 287, 409 | 577,1351 | 125, 289, 407 |
| Prokyanidin C1/C2 | C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈ | 3,55 | 867,2130 | 245, 287, 407, 425, 579 | 865,1588 | – |
| 3,4-Dihydroxybenzoová | C ₇ H ₆ O ₄ | 0,97 | 155, 0339 | – | 153,0193 | 91, 109 |
| Kvercetin 3- <i>O</i> -galaktosid/Kvercetin-3- <i>O</i> -glukosid | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | 5,47 | 465,1027 | 85, 127, 153, 303 | 463, 0673 | 255, 271, 300, 301 |
| Kvercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid/Kvercetin-7- <i>O</i> -rhamnosid | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | 5,81 | 449,1078 | 85, 287, 303 | 447,0968 | 151, 178, 229, 301 |
| Kvercetin-acetylglukosid | C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃ | 5,8 | 507,1133 | 303 | 505, 0987 | 255, 271, 300, 301, 463 |
| Chinová kyselina | C ₇ H ₁₂ O ₆ | 0,7 | 193,0706 | – | 191,0561 | 59, 85, 93 |
| Rutin | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 5,46 | 611,1606 | – | 609,1461 | 300, 301 |
| Vitexin | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ | 5,36 | 433,1129 | 283, 313, 349 | 431,0983 | 281, 283, 311, 341, 353 |



Obr. 1. Graf relativních intenzit jednotlivých sloučenin v odvaru řepíku lékařského, data z pozitivního módu ionizace; barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy



Obr. 2. Graf relativních intenzit jednotlivých sloučenin ve vyluhu řepíku lékařského, data z pozitivního módu ionizace; barevná verze obrázku je dostupná na webových stránkách časopisu Chemické listy

noidů a fenolových kyselin. Na základě analýzy byla potvrzena přítomnost 16 látek z vytvořené databáze. Jednalo se o 8 látek ze skupiny flavonoidů, 2 ze skupiny taninů a 6 ze skupiny fenolových kyselin. Jejich výčet je uveden v tab. I.

Identifikace sloučenin byla prováděna s pomocí funkce MasterView programu PeakView, která na základě zhodnocení shody naměřené molekulové hmoty sledovaného iontu, retenčních časů, izotopového profilu a vložených dat vyhodnotí přítomnost či nepřítomnost dané látky. Potvrzení bylo provedeno na základě shody naměřených fragmentačních spekter látek a spekter dostupných z internetové databáze Metlin (https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage), případně dle shody s literaturou.

Chromatografické profily obou typů vodných extraktů byly prakticky shodné, rozdíl byl pozorován pouze v celkové intenzitě signálu detekovaných metabolitů vyluhů.

Jak dokumentují obr. 1 a 2, dominantně byly zastoupeny látky ze skupiny flavonoidů, které tvořily 59–63 % relativního zastoupení identifikovaných látek. Skupina fenolových kyselin tvořila kolem 23 %. Taniny byly zastoupeny v nejmenším procentu (13–16 %) a jednalo se o látky typu prokyanidinů. Ačkoli se dle literatury v řepíku vyskytují prokyanidiny různého typu (např. prokyanidin B1, B2, B3, B6, B7), byly identifikovány pouze jako suma všech těchto látek, jelikož se jedná o isomery a v rámci chromatografické separace se nerozdělily.

Závěr

Cílový screening technikou UHPLC-HRMS/MS umožnil prokázat přítomnost dominantních biologicky aktivních látek ve vodných extraktech řepíku lékařského. Pro jejich kvantifikaci bude třeba mít k dispozici analytické standardy čistých sloučenin. V navazujícím výzkumu bude studován celý metabolom různě připravených extraktů řepíku lékařského pomocí necílového screeningu (fingerprintingu); porovnávána bude i jejich biologická aktivita.

Tato práce byla podpořena projektem výzkumné infrastruktury METROFOOD-CZ (MEYS grant č.: LM2018100).

LITERATURA

1. Muruzovic M. Z., Mladenovic K. G., Stefanovic O. D., Vasic S. M., Comic L. R.: *J. Food Drug Anal.* **24**, 539 (2016).
2. Tobyn G., Denham A., Whitelegg M., v knize: *Medical Herbs* (Tobyn G., Denham A., Whitelegg M., ed.), str. 47. Churchill Livingstone, Edinburgh 2011.
3. Kuczmannova A., Gal P., Varinska L., Tremel J., Kovac I., Novotny M., Vasilenko T., Dall'Acqua S., Nagy M., Mucaji P.: *Molecules* **20**, 20538 (2015).
4. Paluch Z., Biriczova L., Pallag G., Marques E.C., Vargova N., Kmonickova E.: *Physiol. Res.* **69**, 555 (2020)
5. Correia H., Gonzalez-Paramas A., Amaral M. T., Santos-Buelga C., Batista M. T.: *Biomed. Chromatography* **20**, 88 (2006).
6. Santos T. N., Costa G., Ferreira J. P., Liberal J., Francisco V., Paranhos A., Cruz M. T., Castelo-Branco M., Figueiredo I. V., Batista M. T.: *Evidence-Based Complimentary Alternative Medicine* **2017**, 13 8309894.

A. Loučková, K. Hůrková, and J. Hajšlová
(*Department of Food Analysis and Nutrition, University of Chemistry and Technology, Prague*): **Characterization of Biologically Active Compounds in *Agrimonia eupatoria***

Agrimonia eupatoria is a plant widely used in traditional medicine due to its wide range of healing effects. These include, for example, the positive effect on the healing of chronic wounds which is attributed to the content of various bioactive substances but the exact mechanism of this effect of *Agrimonia* is not known. In this work, two differently prepared aqueous extracts of *Agrimonia* were analysed in order to describe the differences between their contents of bioactive substances. First extract was prepared by pouring hot water over *Agrimonia* with subsequent leaching; second extract (decoction) was prepared by boiling *Agrimonia* in water. Instrumental analysis of prepared extracts was performed by ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) and the target screening in extracts was performed according to the database of substances created by us from the data obtained from the literature. The database of substances contained 37 compounds from the groups of tannins, flavonoids and phenolic acids. Based on the analysis and identification of substances, the presence of 16 substances out of 37 was confirmed. The extracts showed minimal differences in the contents of substances, differing only in their total amount which was higher in the extract prepared by leaching.

Keywords: *Agrimonia eupatoria*, UHPLC-HRMS/MS, contents of bioactive substances

Acknowledgements

This work was supported by METROFOOD-CZ research infrastructure project (MEYS Grant No: LM2018100) including access to its facilities.