

## ŠTÚDIUM AVENANTRAMIDOV AKO VÝZNAMNÝCH BIOLOGICKY AKTÍVNYCH LÁTOK FENOLOVÉHO CHARAKTERU

KATARÍNA KULICHOVÁ, JOZEF SOKOL  
a MÁRIA MALIAROVÁ

Katedra chémie, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv.  
Cyrila a Metoda v Trnave, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava  
katarinakulich@gmail.com

Došlo 4.10.17, prepracované 1.3.18, prijaté 12.3.18.

Kľúčové slová: avenantramidy, biologické účinky,  
metódy stanovenia

### Obsah

1. Úvod
2. Avenantramidy
  - 2.1. Antioxidačné účinky
  - 2.2. Účinok avenantramidov v procese aterosklerózy
  - 2.3. Účinok avenantramidov v spojitosti s onkologickým ochorením
  - 2.4. Metabolizmus avenantramidov a ich farmakokinetika
3. Metódy extrakcie a stanovenie avenantramidov
4. Záver

### 1. Úvod

Biologicky aktívne látky predstavujú významné zložky ako súčasť živých organizmov. Predmetom záujmu sa stávajú nie len v medicíne a farmácii, ale aj v odboroch, ako je analytická chémia, biochémia, či mnohé iné. Jednotlivé druhy biologicky aktívnych látok sa od seba výrazne odlišujú svojou štruktúrou, pôsobením, lokalizáciou, pozitívnymi, resp. negatívnymi účinkami, či mechanizmom pôsobenia a potreba ich štúdia spolu s ich metabolickými procesmi neustále narastá.

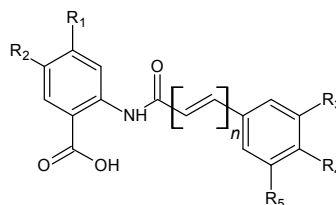
V súčasnosti viaceré štúdie poukazujú na význam stravy ako významného faktora pri vzniku rozvoja kardiovaskulárnych ochorení. Okrem ovocia a zeleniny sa do popredia dostáva konzumácia cereálnych produktov. Jedným z čoraz viac študovaných cereálnych produktov predstavuje ovos ako významný zdroj avenantramidov (AVN). Ide o biologicky aktívne fenolové látky, prítomné výlučne v ovsí. Vyznačujú sa antioxidačnými účinkami, majú vplyv v aterogénnych procesoch, v procesoch onkologických ochorení, v zápalovom procese a pri ochoreniach, ako je diabetes mellitus či dermatologické ochorenia. Tento prehľadový článok sa venuje avenantramidom,

ich biologickým účinkom, významným postavením pri kardiovaskulárnych a onkologických ochoreniach, ako aj metabolizmu, farmakokinetike a aktuálnym analytickým metódam stanovenia AVN.

### 2. Avenantramidy

Avenantramidy predstavujú rozpustné polyfenoly s nízkou molekulovou hmotnosťou a ich existencia je výlučne spojená s jedinou cereáliou – ovsom, kde pôsobia ako fytoalexíny produkované v reakcii na patogény<sup>1</sup>. AVN boli objavené v roku 1989 Collinsom a spol. a najskôr boli zaradené medzi alkaloidy<sup>2</sup>. Doteraz bolo v semenách a vegetatívnych častiach ovsu nájdených viac ako 25 rôznych AVN a ďalšie boli syntetizované v laboratóriu<sup>3,4</sup>. Z chemického hľadiska sa jedná o amidy škoricových kyselín alebo kyseliny avenalumovej s rôznymi hydroxy- a metoxy-derivátmi kyseliny antranilovej (obr. 1). Triviálne názvoslovie AVN doteraz nie je úplne jednotné. Podľa svojho kanadského objaviteľa Williama Collinsa sú AVN označené veľkými písmenami v abecednom poradí, tak ako boli postupne objavené. Označenie podľa švédskej výskumníčky Leny Dimberg v sebe zahŕňa štruktúralne prvky molekuly a je tvorený z čísla a písmena. Antranilová časť molekuly je označená číslom série 1 až 5 a môže ju tvoriť samotná kyselina antranilová (1), 5-hydroxyantranilová (2), kyselina 5-hydroxy-4-metoxyantranilová (3), 4-hydroxyantranilová (4) a aj 4,5-dihydroxyantranilová (5) (cit.<sup>5,6</sup>). Písmenom je označená druhá časť molekuly a tvorí ju zvyšok kyseliny kávovej (c), *p*-kumarovej (p), sinapovej (s), ferulovej (f). V prípade kyseliny avenalumovej a jej derivátov, ktoré majú v lineárnej časti molekuly o jednu dvojitzú väzbu viac, je v názve index <sub>d</sub> (cit.<sup>7</sup>). V tab. I sú uvedené názvy týchto zlúčenín podľa oboch výskumníkov.

V zrne ovsu sú najviac zastúpené tri AVN: *N*-[3',4'-dihydroxy-(*E*)-cinnamoyl]-5-hydroxyantranilová kyselina



Obr. 1. Chemická štruktúra avenantramidov. R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> a R<sub>5</sub> je bližšie špecifikované v tab. I

Tabuľka I  
Označenie avenantramidov podľa Williama Collinsa a Leny Dimberg

| Označenie avenantramidu |                 | n        | Substituent    |                  |                        |                  |                  |
|-------------------------|-----------------|----------|----------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|
| Collins                 | Dimberg         |          | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub>         | R <sub>4</sub>   | R <sub>5</sub>   |
|                         | 1a              | 1        | H              | H                | H                      | H                | H                |
| D                       | 1p              | 1        | H              | H                | H                      | OH               | H                |
| F                       | 1c              | 1        | H              | H                | OH                     | OH               | H                |
| E                       | 1f              | 1        | H              | H                | OCH <sub>3</sub>       | OH               | H                |
|                         | 1s**            | 1        | H              | H                | OCH <sub>3</sub>       | OH               | OCH <sub>3</sub> |
|                         | 2a              | 1        | H              | OH               | H                      | H                | H                |
| <b>A*</b>               | <b>2p</b>       | <b>1</b> | <b>H</b>       | <b>OH</b>        | <b>H</b>               | <b>OH</b>        | <b>H</b>         |
| <b>C*</b>               | <b>2c</b>       | <b>1</b> | <b>H</b>       | <b>OH</b>        | <b>OH</b>              | <b>OH</b>        | <b>H</b>         |
| <b>B*</b>               | <b>2f</b>       | <b>1</b> | <b>H</b>       | <b>OH</b>        | <b>OCH<sub>3</sub></b> | <b>OH</b>        | <b>H</b>         |
|                         | 2s**            | 1        | H              | OH               | OCH <sub>3</sub>       | OH               | OCH <sub>3</sub> |
|                         | 3a              | 1        | OH             | OCH <sub>3</sub> | H                      | H                | H                |
|                         | 3p              | 1        | OH             | OCH <sub>3</sub> | H                      | OH               | H                |
|                         | 3c              | 1        | OH             | OCH <sub>3</sub> | OH                     | OH               | H                |
|                         | 3f              | 1        | OH             | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub>       | OH               | H                |
|                         | 3p**            | 1        | OH             | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub>       | OH               | OCH <sub>3</sub> |
|                         | 4p              | 1        | OH             | H                | H                      | OH               | H                |
|                         | 4c              | 1        | OH             | H                | OH                     | OH               | H                |
|                         | 4f              | 1        | OH             | H                | OCH <sub>3</sub>       | OH               | H                |
| AA                      | 5p              | 1        | OH             | OH               | H                      | OH               | H                |
| CC                      | 5c              | 1        | OH             | OH               | OH                     | OH               | H                |
| BB                      | 5f              | 1        | OH             | OH               | OCH <sub>3</sub>       | OH               | H                |
| O                       | 2p <sub>d</sub> | 2        | H              | OH               | H                      | OH               | H                |
| P                       | 2f <sub>d</sub> | 2        | H              | OH               | OCH <sub>3</sub>       | OH               | H                |
| Tranilast               |                 | 1        | H              | H                | OCH <sub>3</sub>       | OCH <sub>3</sub> | H                |

(2c), *N*-[4'-hydroxy-(*E*)-cinnamoyl]-5-hydroxyantranilová kyselina (2p) a *N*-[4'-hydroxy-3'-metoxy-(*E*)-cinnamoyl]-5-hydroxyantranilová kyselina (2f).

Chemická štruktúra AVN je veľmi podobná liečivu tranilast (Rizaben), čo je *N*-[3',4'-dimetoxo-(*E*)-cinnamoyl]-antranilová kyselina, ktoré je používané ako antialergikum pri liečbe astmy, autoimunitných chorôb a dermatóz<sup>8</sup>.

AVN sú pomerne stabilné zlúčeniny v kyslom a neutrálnom prostredí, avšak v alkalickom prostredí pri teplote 95 °C sa rozkladajú. Najmenej stabilný je avenantramid 2c, ktorý je úplne degradovaný už pri pH 10 (cit.<sup>9</sup>).

Prítomnosť AVN bola dokázaná predovšetkým v ovsených zrnách – otrubách a subaleurónových vrstvách, ale môžu byť prítomné aj v iných častiach rastliny<sup>3,10</sup>. AVN boli v ovsí dokázané v pomerne vysokých koncentráciách (200 mg kg<sup>-1</sup>)<sup>10</sup>.

### 2.1. Antioxidačné účinky avenantramidov

AVN účinkujú v rastline ovsia sateho ako antipatogény – fytoalexíny a sú produkované ako odpoveď na napad-

nutie patogénom<sup>11–13</sup>. V rastline sú syntetizované *de novo* po elicitácii v rámci metabolizmu fenylpropanoidov.

AVN vykazujú viacero významných biologických účinkov a to v *in vitro* aj v *in vivo* podmienkach. Peterson, Bratt, Fagerlung a Ishihara so svojimi kolektívmi študovali antioxidačné účinky AVN zhasaním DPPH radikálu a to izolovaných aj synteticky pripravených AVN (cit.<sup>4,6,14,15</sup>). Ich závery možno zhrnúť naledovne: AVN **1a**, ktorý neobsahuje žiadnu hydroxylovú skupinu, nemá žiadnu antioxidačnú aktivitu. AVN s jednou hydroxyskupinou na jednom a/alebo na druhom aromatickom kruhu (**2a**, **1p** a **2p**) majú veľmi nízku antioxidačnú aktivitu. Prítomnosť metoxy-skupiny v orto-pozícii ku hydroxy-skupine (**1f**, **2f**, **3a**, **3p** a **3f**) aktivitu podstatne zvyšuje. Pridaním ďalšej metoxy-skupiny alebo jej výmenou za hydroxy-skupinu antioxidačná aktivita ďalej stúpa. Antioxidačná aktivita AVN stúpa teda v poradí **p** < **f** < **s** < **c** vo všetkých sériách. Ďalej porovnaním antioxidačnej aktivity metoxy-derivátov **3a** a **1f** sa dokonca zistil väčší význam substitúcie na antranilovej časti molekuly (kruh A) oproti škoricovej časti molekuly (kruh B). Zatiaľ najvyššia antioxidačná aktivita

v DPPH teste bola pozorovaná u AVN odvodených od 4,5-dihydroxyantranilovej kyseliny. V prípade hydroxyškoricových kyselín významne prispieva k zvýšeniu antioxidačnej aktivity dodatočná konjugácia dvojitej väzby k aromatickému kruhu. V prípade AVN je konjugácia medzi oboma aromatickými kruhmi pre prítomnosť amidovej väzby zoslabená a kruh A a kruh B sa podieľajú na antioxidačnej aktivite nezávisle<sup>14,15</sup>.

Antioxidačná aktivita AVN bola tiež študovaná v linoleátovom teste. AVN s jednou a viac hydroxyskupinami inhibovali oxidáciu kyseliny linolovej, antioxidačná aktivita stúpala v poradí  $p < f < c$  (cit.<sup>15</sup>).

Lee-Manion a spol. porovnávali antioxidačnú aktivitu AVN série **1** a **2** a taktiež samotné hydroxyškoricové kyseliny (kávovú, *p*-kumarovú, ferulovú a sinapovú) a to v teste DPPH a FRAP. V zhode s predchádzajúcimi autormi potvrdili vyššiu antioxidačnú aktivitu AVN série **2** oproti sérii **1** a samotné hydroxyškoricové kyseliny sa svojou aktivitou nachádzajú medzi týmito dvoma sériami AVN. Avšak antioxidačná aktivita AVN na rozdiel od predchádzajúcich autorov stúpala v poradí  $f < p < c$  v oboch testoch. Túto skutočnosť možno vysvetliť rozdielnym usporiadaním experimentov (reakčné podmienky, čas, koncentrácie). Tranilast ani v jednom teste nevykazoval antioxidačný účinok<sup>16</sup>.

Yang a spol. sledovali antioxidačnú kapacitu majoritných AVN voči kyslíkovým radikálom, akými sú peroxylový a hydroxylový radikál, superoxidový aniónradikál, singletový kyslík a peroxynitrit. Antioxidačná kapacita AVN **2c** bola 1,5× vyššia ako **2f** a **2p** (cit.<sup>17</sup>).

Antioxidačná aktivita AVN bola potvrdená aj v *in vivo* testoch, a to aj na zvieracích modeloch, aj na ľudských dobrovoľníkoch. Experimenty antioxidačných aktivít AVN *in vivo* u potkanov ukázali, že AVN **2c** zoslabuje produkciu ROS v niektorých tkanivách a zároveň zvyšuje aktivitu niektorých enzýmov, ktoré sú charakteristické antioxidačnou aktivitou<sup>18</sup>. Okrem toho AVN preukázali zvýšenú antioxidačnú kapacitu u ľudí a ich pôsobenie bolo synergické s vitamínom C na ochranu proti oxidácii LDL u škrečkov<sup>19</sup>.

Štúdia na ľuďoch (120 zdravých jedincov s dennou dávkou 3,12 mg AVN po dobu jeden mesiac) preukázala zvýšenie superoxidodismutázy o 8,4 % a redukovaného glutatiónu o 17,9 % ( $P < 0,05$ )<sup>20</sup>. Výsledky tohto experimentu naznačujú asociáciu s nepriamou antioxidačnou odpoveďou prostredníctvom zvýšenej endogénnej antioxidačnej enzymatickej aktivity *in vivo*<sup>21</sup>.

Nie len samotné AVN, ale aj obilné zmesi obohatené týmito polyfenolickými látkami po konzumácii preukázali zvýšenú antioxidačnú aktivitu *in vivo*. Tento proces nastal prostredníctvom zvyšovania redukovaného glutatiónu<sup>22</sup>. Glutatión ako hlavný intracelulárny antioxidant slúži ako kofaktor enzýmov. V antioxidačnej aktivite významnú úlohu zohrávajú enzýmy ako glutatiónperoxidáza a glutatiónreduktáza a v procese detoxikácie xenobiotík enzým glutatión-*S*-transferáza. V opačnom prípade pri znižovaní, či už redukovanej alebo oxidovanej formy glutatiónu sa prejaví oxidačný stres<sup>4</sup>.

Taktiež sa sila antioxidačnej aktivity AVN potvrdila aj v spojitosti s inými antioxidantami (vitamín E)<sup>15</sup>. Antioxidačná aktivita AVN závisí aj od samotnej štruktúry. Počas experimentov sa preukázalo, že ako najúčinnjšia forma antioxidačnej aktivity AVN je forma **2c** (cit.<sup>4,23</sup>). Medzi **2f** a **2p** neboli zistené významné rozdiely. Zároveň experiment preukázal aj rozdielne účinky na inhibíciu NF- $\kappa$ B medzi tromi formami AVN. Tieto rozdielne účinky sú pripisované rozdielnej štruktúre<sup>17</sup>. Štúdie preukázali až 30násobne vyššiu aktivitu ako iné fenolické zlúčeniny nachádzajúce sa v ovse. AVN majú schopnosť inhibovať srdcovocievne ochorenia, ako aj proliferáciu buniek hladkého svalstva a podieľajú sa na potlačení expresie adhézných molekúl z buniek prostredníctvom inhibície cytokínu IL-1p (cit.<sup>19,24,25</sup>).

Ukázalo sa, že AVN majú aj potenciál aktivity v protizápalových procesoch a taktiež potláčajúce svrbenie<sup>26</sup>. Po aplikácii ovsených vločiek lokálne, boli preukázané protizápalové a protidráždiace účinky<sup>27</sup>. AVN taktiež preukázali účinnosť voči ochoreniam atopickej dermatitíde, psoriáze, ale aj voči vyrážkam, ktoré boli indukované liekmi a preukázali protizápalové a antihistamínové aktivity<sup>26</sup>.

## 2.2. Účinok avenantramidov v procese aterosklerózy

Vo všeobecnosti je ovos známy farmakologický prípravok, ktorý sa používa na spracovanie pri viacerých ochoreniach. Publikácie opisujú použitie ovsu ako významnej zložky pre zníženie LDL cholesterolu<sup>28</sup>. Taktiež bolo dokázané, že zvýšenou konzumáciou ovsu sa podporuje funkcia endotelových buniek zohrávajúcich podstatnú úlohu pri kardiovaskulárnych ochoreniach<sup>29</sup>. AVN, ktoré boli izolované z ovsu, preukázali potlačenie produkcie viacerých molekúl, ktoré sú zodpovedné za rozvoj aterosklerózy. Kľúčovú úlohu v tomto procese zohráva proliferácia buniek, ktoré vyplňajú hladkú svalovinu ciev<sup>30</sup>. Predišť zúženiu lumenu ciev je možné aj znižovaním LDL cholesterolu, ako aj znižovaním triacylglycerolov a zároveň inhibovať arteriálnu proliferáciu buniek ciev hladkej svaloviny. Pri riziku vzniku kardiovaskulárneho ochorenia je dôležité klásť dôraz na zdravú výživu a dostatočný prísun bioaktívnych zložiek<sup>24</sup>. Pri iniciácii, ako aj rozvoji aterosklerózy zohrávajú dôležitú úlohu bunky cievneho endotelu, ako aj bunky imunitného systému. Cytokiníny, chemokiníny a adhézne molekuly predstavujú bunky neprotilátkového charakteru, ktoré sa zúčastňujú pri vzniku a rozvoji aterosklerózy<sup>31</sup>.

Liu a spol.<sup>32</sup> podrobnejšie popísali vo svojej publikácii inhibíciu buniek aorty v endotele, potlačenie ich expresie a následne zabránenie adhézie k monocytom. V tejto štúdii bolo dokázané spomalenie produkcie ako aj expresie intracelulárnych adhézných molekúl-1 (ICAM-1), vaskulárnych adhézných molekúl-1 (VCAM-1), E-selektínu a taktiež inhibovanie sekrécie prozápalových cytokínov (IL-6, IL-8, MCP-1) a chemokínov<sup>32</sup>. Produkcia chemokínov a adhézných molekúl produkovaných endotelárnymi bunkami je regulovaná a senzitivne závislá na redoxnej

transdukcií<sup>33</sup>, čo môže úzko súvisieť s interferujúcimi oxidantmi a antioxidantmi<sup>32</sup>. Bolo preukázané, že zvýšená spotreba ovsu koreluje so znížením rizika rozvoja ischemickej choroby srdca. Vysoký obsah vlákniny má za následok výrazné zlepšenie endotelálnej dysfunkcie<sup>34</sup>. Presný mechanizmus tohto účinku nie je zatiaľ úplne známy, ale predpokladá sa, že by to mohlo úzko súvisieť s moduláciou oxidu dusnatého (NO) produkovaného v stenách ciev<sup>35</sup>. Niektoré publikácie preukázali zníženú produkciu NO v prítomnosti aterosklerózy. Znížená produkcia je spájaná s dysfunkciou endotelových buniek, kde nastáva syntéza NO (cit.<sup>36</sup>). V štúdiu z roku 2004 bol uskutočnený experiment, kde sa použil interleukín IL1-1 $\beta$  pre podporu endotelálnych buniek na vyvolanie zápalových procesov v *in vivo* systéme<sup>32</sup>.

S aktiváciou rôznych prozápalových cytokínov je spojená aktivácia NF- $\kappa$ B faktoru<sup>37</sup>. Mechanizmus účinku metylesteru AVN **2c** a AVN **2c** na aktivitu jadrovej transkripcie faktora NF- $\kappa$ B skúmali Guo a spol.<sup>25</sup>, pričom zistili, že metylester AVN **2c** má 10 $\times$  vyšší účinok na inhibíciu proliferujúcich buniek hladkej svaloviny v cievach. Na zvýšenie produkcie NO bol použitý metylester AVN **2c**, ktorý má tlmiaci účinok na aktiváciu NF- $\kappa$ B (cit.<sup>25</sup>).

### 2.3. Účinok avenantramidov v spojitosti s onkologickým ochorením

Je známe, že konzumácia vlákniny môže súvisieť so zníženým rizikom nádorových ochorení. Konzumácia celých zŕn znižuje riziko vzniku viacerých typov karcinómov. AVN preukázali pozitívne účinky v procese onkologických ochorení, avšak potlačenie nádoru závisí od konkrétneho typu karcinómu. Bolo preukázané, že AVN **2c** spôsobuje apoptózu buniek karcinómu prsníka a v budúcnosti by mohol predstavovať potenciálne chemoterapeutikum<sup>38</sup>. Okrem karcinómu prsníka bol zaznamenaný priaznivý účinok AVN pri karcinóme pečene, kolorektálnom karcinóme<sup>39</sup> a karcinóme kože<sup>40</sup>. Viaceré štúdie boli venované predovšetkým kolorektálnemu karcinómu vzhľadom na asociáciu tráviacej sústavy s hrubým črevom. Pri konzumácii celých zŕn bolo preukázané zníženie vzniku kolorektálneho karcinómu o 25 % (cit.<sup>41</sup>).

V nádorových procesoch sa AVN vyznačujú význačnou vlastnosťou – inhibíciou proliferácie. Tieto vlastnosti boli dokázané pri kolorektálnom karcinóme. Makrofágy exprimujúce enzým cyklooxygenázu COX-2 sú spojené s patogenézou kolorektálneho karcinómu. COX-2 nie je prítomná, resp. je prítomná v nízkych koncentráciách vo fyziologických tkanivách<sup>42</sup>. Opakom je jej vysoká exprimácia a to až v 80–85 % v ľudských adenokarcinómoch, nádoroch hrubého čreva a myších adenómoch<sup>43</sup>. Inhibíciou enzýmu cyklooxygenáza (COX) sa blokuje syntéza prostaglandínov (PG) – derivátov kyseliny arachidónovej, ktorá je súčasťou bunkových membrán. Prostaglandín E2 (PGE2), ktorý vzniká prostredníctvom COX-2, je asociovaný s epitelovou karcinogenezou v gastrointestinálnom trakte<sup>44</sup>. PGE2 inhibuje smrť buniek, stimuluje bunkovú migráciu, proliferáciu a s tumorom asociovanú neovasku-

larizáciu. Tieto poznatky vedú k domienke, že COX-2 by sa mohla posúvať do pozície chemopreventívneho kolorektálneho karcinómu<sup>45</sup>.

### 2.4. Metabolizmus avenantramidov a ich farmakokinetika

AVN boli študované aj z hľadiska metabolizmu a farmakokinetiky. Štúdium spomínaných fytochemikálií a ich biologická dostupnosť sa stávala čoraz zaujímavejšia na štúdium. AVN boli merané v plazme a to predovšetkým u škrečkov<sup>19</sup>, ale publikované boli aj štúdie farmakokinetiky AVN v ľudskej plazme. Koncentrácia AVN bola merná po konzumácii obilnej zmesi bohatej na ovos. Už 15 min po konzumácii bola preukázaná zvýšená koncentrácia AVN a to vo všetkých troch formách (**2p**, **2f**, **2c**), avšak najvýznamnejšiu biologickú dostupnosť preukázala forma **2p** (cit.<sup>22</sup>). Forma **2c** prejavila najnižšiu rýchlosť eliminácie a najdlhší polčas v porovnaní s **2p** a **2f** (cit.<sup>46</sup>).

Na základe rozdielnych metabolických ciest u ľudí a škrečkov bolo zistené, že farmakokinetická štúdia u škrečkov dosiahla hodnotu maximálneho času 40 min. U ľudí maximálny čas farmakokinetiky dosiahol 1,5–2,3 hodiny. To poukazuje na fakt, že AVN vzhľadom na ich absorpciu v metabolizme sú druhovo závislé<sup>22</sup>. Avšak v štúdiách boli zistené veľké rozdiely v množstve AVN v komerčných potravinárskych produktoch a v surových zrnách ovsu, čo naznačuje, že tvrdenie o obsahu AVN v ovsených výrobkoch by mohlo slúžiť ako stratégia diferenciácie produktov<sup>47</sup>.

## 3. Metódy extrakcie a stanovenie avenantramidov

AVN sú rozpustné v organických rozpúšťadlách, ako sú etylacetát, dietyléter, acetón<sup>47</sup>, ale najčastejšie používaným rozpúšťadlom je alkohol<sup>48</sup>. Uvádza sa predovšetkým extrakcia v 50% a 80% etanolových roztokoch. Novšie štúdie uvádzajú použitie hexánu, ale aj superkritickej tekutiny<sup>49</sup>. Podmienky extrakcie boli tiež optimalizované metódou odozvočných plôch (RSM) vzhľadom na maximálny výtťažok troch majoritných AVN – **2c**, **2p** a **2f**. Zistilo sa, že najvhodnejšie zloženie extrakčného roztoku je 70% (v/v) vodný roztok metanolu a teplota 55 °C (cit.<sup>50</sup>). Pri porovnaní extrakcie asistovanej ultrazvukom a bez použitia ultrazvuku bolo preukázané, že ultrazvuková extrakcia je časovo výhodnejšia a preukázala vyšší výtťažok. Taktiež bol zvýšený výtťažok AVN dosiahnutý zvýšením teploty<sup>51</sup>. Nevhodnú voľbu predstavuje Soxletova extrakcia vzhľadom na nízku stabilitu AVN (cit.<sup>3</sup>).

Najčastejšie uvádzaná separácia AVN je vykonávaná prostredníctvom vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie, pričom ide o použitie reverznej fázy – C18. Na detekciu AVN je používaný spektrofotometrický detektor (UV, DAD). Nevýhodou použitia UV/DAD detekcie je limit kvantifikácie približne 100–400 ng ml<sup>-1</sup> pre AVN (cit.<sup>52</sup>), čo neumožňuje kvantifikáciu AVN pri nízkych koncentrá-

Tabuľka II  
Analytické podmienky separácie avenantramidov

| Matrica                                 | Extrakcia  | Stacionárna fáza/kolona                        | Mobilná fáza   | Detekcia                  | Lit. |
|---|--|--|--|---------------------------|------|
| 7 odrôd ovsa                            | 80% EtOH, 10mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2,8); 3 × 10 min     | C-18, PhenomenexLuna, (4,6 × 250 mm, 5 μm)     | A: 5% MeCN, 0,1% HCOOH<br>B: MeCN s 0,1% HCOOH   | DAD<br>340 nm             | 5    |
| Klásky a listy (9 odrôd)                | 80% EtOH, 3 × 20 min pri 50 °C   | Genesis C18 (4,6 × 150 mm; 4 μm)               | A: 10 mM HCOOH<br>B: MeCN  | MS (API-ES)               | 54   |
| 6 vzoriek ľud. plazmy (3 ženy a 3 muži) | enzýmová hydrolyza, extrakcia MeCN                                       | Zorbax ODS C18 (4,6 × 150 mm; 3,5 μm)          | A: 75 mM C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> (COOH) <sub>3</sub> , 25 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , 10% MeCN<br>B: 75 mM C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> (COOH) <sub>3</sub> , 25 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , 50% MeCN | elektrochemická           | 22   |
| Ovsené sušienky                         | 100% MeCN  | Supelco kolóna C18                             |  | DAD<br>330 nm             | 55   |
| Ovos z miestneho marketu (Čína)         | 80% EtOH bežná extrakcia/ extrakcia ultrazvukom                          | Dionex Acclaim 120 C18 (5 μm, 4,6 mm × 150 mm) | A: 0,1% CH <sub>3</sub> COOH<br>B: MeCN  | DAD<br>280 nm             | 51   |
| 6 ovsených produktov a 51 vzoriek ovsa  | 80% EtOH   | Halo C18 (2,7 μm, 50 × 3,2 mm)                 | A: 0,1% HCOOH v H <sub>2</sub> O<br>B: 0,1% HCOOH v MeOH   | API3000 trojitý kvadrupól | 47   |
| Vzorky ovsa (Čína)                      | EtOH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (80:20:0,1) 2 hodiny pri 4 °C | ProSphere C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)             | A: 10 mM HCOOH<br>B: MeCN  | UV<br>340 nm              | 56   |
| Vzorky ovsa (Taliano)                   | EtOH   | LiChroCART C18 (250 × 4 mm, 5 μm)              | A: MeCN<br>B: 0,1% HCOOH   | UV<br>330 nm<br>MS (ESI)  | 57   |
| 39 odrôd ovsa (Čína)                    | 80% EtOH   | Dikma Technologies Co C18 (4,6 × 250 mm, 5 μm) | A: 0,1% HCOOH<br>99,9% MeCN<br>B: 0,1% HCOOH, 5% MeCN, 94,9% H <sub>2</sub> O  | UV<br>340 nm              | 58   |
| Ľudský biologický materiál              |  | Bifenilová kolóna Kinetex (250 × 4,6 mm, 5 μm) | A: 0,1% HCOOH v H <sub>2</sub> O<br>B: 0,1% HCOOH v MeOH   | 254, 280<br>320 nm        | 59   |
| Ľudský biologický materiál              | SP extrakcia   | H SS T3 (2,1 × 100 mm, 1,8 μm)                 | A: 0,1% HCOOH v H <sub>2</sub> O<br>B: 0,1% HCOOH v MeCN   | MS-MS                     | 59   |

ciach. Chen a spol. publikovali použitie elektrochemickej detekcie pre identifikáciu a kvantifikáciu AVN v ovse a ľudskej plazme<sup>22</sup>. Elektrochemická detekcia je na AVN citlivá, ale len čiastočne selektívne, čo vyžaduje starostlivý výber a prípravu mobilnej fázy. Taktiež nevýhodou je aj finančná náročnosť elektrochemického detektora. Kvapalinová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou je široko používanou metódou vďaka svojej vysokej citlivosti a dynamickému rozsahu<sup>53</sup>. V roku 2006 bola vyvinutá metóda kvantifikácie HPLC-MS (kvadrupól),

ktorá umožňuje kvantifikáciu troch hlavných AVN (**2c**, **2p**, **2f**)<sup>47</sup>, pričom ide o metódu 3× citlivejšiu s porovnaním HPLC-DAD/ HPLC-UV (cit.<sup>52</sup>). Vyvinutá metóda je rýchla, citlivá a presná s dobrou opakovateľnosťou a experimentálne postupy sú jednoduché a mali by byť ľahko opakovateľné v laboratóriách<sup>47</sup>. Prehľad niektorých extrakčných postupov ako aj podmienok separácie je uvedený v tab. II.

#### 4. Záver

Prehľadový článok sa zaoberá vybranou skupinou biologicky aktívnych látok – avenantramidmi. Keďže tieto významné fenolové látky preukázali viaceré zaujímavé vlastnosti, neustále sa zvyšuje a prudko narastá potreba ich štúdiá, jednak z hľadiska antioxidačných vlastností, ale aj z hľadiska priaznivých účinkov, ktoré boli dokázané pri kardiovaskulárnych, onkologických, v protizápalových procesoch a pri ochoreniach, ako je diabetes mellitus, či rôzne dermatologické ochorenia. Vzhľadom na fakt, že kardiovaskulárne ochorenia spolu s nádorovými ochoreniami predstavujú najvýznamnejšie celosvetové ochorenia, končiacie v mnohých prípadoch smrťou, narastá potreba získania akýchkoľvek nových informácií, ktoré by napomohli včasnej diagnostike. Článok ponúkol prehľad biologických účinkov AVN, ako aj extrakčných a chromatografických analýz, čo tieto látky dáva do pozície potenciálnych kandidátov pri hľadaní nových terapií v protinádorových a kardiovaskulárnych procesoch, či iných rôznych ľudských ochoreniach.

*Táto práca vznikla vďaka podpore grantov KEGA 006UCM-4/2018, VEGA 1/0919/17 a APVV-0758-11.*

#### LITERATÚRA

- Meydani M.: *Nutr. Rev.* 67, 731 (2009).
- Collins, F. W.: *J. Agric. Food Chem.* 37, 60. (1989).
- Dimberg L. H., Theander O., Lingnert H.: *Cereal Chem.* 70, 637 (1993).
- Bratt K., Sunnerheim K., Bryngelsson S., Fagerlund A., Engman L., Andersson R. E., Dimberg L. H.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 594 (2003).
- Chu Y., Wise M. L., Gulvady A. A., Chang T., Kendra D. F., Klinken B. J., Shi Y., O'Shea M.: *Food Chem.* 139, 426 (2013).
- Ishihara A., Kojima K., Fujita T., Yamamoto Y., Nakajima H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 1975 (2014).
- Collins F. W., McLachlan D. C., Blackwell B. A.: *Cereal Chem.* 68, 184 (1991).
- Isaji M., Miyata H., Ajisawa Y.: *Cardiovasc. Drug Rev.* 16, 288 (1998).
- Dimberg L. H., Sunnerheim K., Sundberg B., Walsh K.: *Cereal Chem.* 78, 278 (2001).
- Peterson D. M., Emmons C. L., Hibbs A. H.: *J. Cereal Sci.* 33, 97 (2001).
- Ishihara A., Ohtsu Y., Iwamura H.: *Phytochemistry* 50, 237 (1999).
- Wise M. L., Doehlert D. C., McMullen M. S.: *Cereal Chem.* 85, 639 (2008).
- Wise M. L.: *J. Agric. Food Chem.* 59, 7028 (2011).
- Peterson D. M., Hahn M., Emmons C. L.: *Food Chem.* 79, 473 (2002).
- Fagerlund A., Sunnerheim K., Dimberg L. H.: *Food Chem.* 113, 550 (2009).
- Lee-Manion A. M., Price R. K., Strain J. J., Dimberg L. H., Sunnerheim K., Welch R. W.: *J. Agric. Food Chem.* 57, 10619 (2009).
- Yang J., Ou B., Wise M. L., Chu I.: *Food Chem.* 160, 338 (2014).
- Ji L. L., Lay D., Chung E., Fu Y., Peterson D. M.: *Nutrit. Res.* 23, 1579 (2003).
- Chen C. Y., Milbury P. E., Kwak H. K., Collins F. W., Samuel P., Blumberg J. B.: *J. Nutrition* 134, 1459 (2004).
- Liu S., Yang N., Hou Z., Yao Y., Lu L., Zhou X., Ren G.: *Agric. Sci. China* 10, 1301 (2011).
- Dinkova-Kostova A.T., Cheah J., Samouilov A., Zweier J.L., Bozak R.E., Hicks R.J., Talalay P.: *Med. Chem.* 3, 261 (2007).
- Chen C. Y., Milbury P. E., Collins F. W.: *J. Nutrition* 137, 1375 (2007).
- Maliarová M., Maliar T., Krošlák E., Sokol J., Nemeček P., Nechvátal P.: *J. Food Nutr. Res.* 54, 346 (2015).
- Nie L., Wise M., Peterson D., Meydani M.: *Free Radical Biol. Med.* 41, 702 (2006).
- Guo W., Wise M. L., Collins F.W., Meydani M.: *Free Radical Biol. Med.* 44, 415 (2008).
- Sur R., Nigam A., Grote D., Liebel F., Southall M. D.: *Arch. Dermatol. Res.* 300, 569 (2008).
- Cerio R., Dohil M., Jeanine D., Magina S., Mahé E., Stratigos A. J.: *J. Drugs Dermatol.* 9, 1116 (2010).
- Truswell A. S.: *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, 1 (2002).
- Anderson J. L., Habashi J., Carlquist J. F., Muhlestein J. B., Horne B. D., Bair T. L., Pearson R. R., Hart N.: *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 1248 (2000).
- Braun-Dullaues R. C., Mann M. J., Dzau V. J.: *Circulation* 98, 82 (1998).
- Stemme S., Hansson G. K.: *Ann Med.* 26, 141 (1994).
- Liu L., Zubik L., Collins F. W., Marko M., Meydani M.: *Atherosclerosis* 175, 39 (2004).
- Li H., Cybulsky M. I., Gimbrone M. A., Libby P.: *Arterioscler Thromb.* 13, 197 (1993).
- Katz D. L., Nawaz H., Boukhalil J., Chan W., Ahmadi R., Giannamore V., Sarrel P. M.: *Prev. Med.* 33, 476 (2001).
- Lim T. K.: *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*. Springer Science & Business Media, New York 2013.
- Felaco M., Grilli A., De Lutiis M. A., Patruno A., Libertini N., Taccardi A. A., Di Napoli P., Di Giulio C., Barbacane R., Conti P.: *Ann. Clin. Lab. Sci.* 31, 179 (2001).
- Kulms D., Schwarz T.: *Vitam. Horm.* 74, 283 (2006).
- Hastings J., Kenealey J.: *Cancer Cell Int.* 17, 93 (2017).
- Scarpa E. S., Antonini E., Palma F., Mari M., Ninfali P.: *Eur. J. Nutr.* 2017, 1.
- Larsson S. C., Orsini N., Wolk A.: *J. Natl. Cancer Inst.* 97, 1679 (2005).
- Adom K. K., Liu R. H.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 6182 (2002).
- Eisinger A. L., Prescott S. M., Jones D. A., Stafforini

- D. M.: Prostaglandins Lipid Mediators 82, 147 (2007).
43. Ziegler C. C., Rainwater L., Whelan J., McEntee M. F.: J. Nutr. 134, 5 (2004).
  44. Müller-Decker K., Fürstenberger G.: Mol. Carcinog. 46, 705 (2007).
  45. Marnett L. J., DuBois R. N.: Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 42, 550 (2002).
  46. Zhang T., Shao J., Gao Y., Chen Ch., Yao D., Chu Y. F., Johnson J., Kang Ch., Yeo D., Ji L. L.: Oxid. Med. Cell. Longevity 2017, 1.
  47. Xie Z., Mui T., Sintara M., Ou B., Johnson J., Chu Y., O'shea M., Kasturi P., Chen Y.: Food Chem. 1, 280 (2017).
  48. Cai S., Huang Ch., Ji B., Zhou F., Wise M. L., Zhang D., Yang P.: Food Chem. 3, 900 (2011).
  49. Walters M., Ribeiro A. P. L., Hosseinian F., Tsopmo A.: J. Cereal Sci. 79, 21 (2018).
  50. Maliarova M., Mrazova V., Havrlentova M., Sokola J.: J. Braz. Chem. Soc. 26, 2369 (2015).
  51. Chen C., Wang L., Wang R., Luo X., Li Y., Li J., Li Y., Chen Z.: Food Chem. 15, 260 (2018).
  52. Jastrebova J., Skoglund M., Nilsson J., Dimberg L. H.: Chromatography 63, 419 (2006).
  53. Koistinen V. M., Hanhineva K.: Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 57, 1688 (2017).
  54. Peterson D. M., Dimberg L. H.: J. Cereal Sci. 47, 101 (2008).
  55. Koenig R., Dickman J. R., Kang Ch., Zang T., Chu Y., Ji L.: Nutr. J. 13, 21 (2014).
  56. Ren Y., Yang X., Niu X., Liu S., Ren G.: J. Agric. Food Chem. 59, 206 (2011).
  57. Antonini E., Diamantini G., Ninfali P.: J. Food Sci. Technol. 54, 2613 (2017).
  58. Li X., Li M., Ling A. Hu X., Ma Z., Liu L., Li Y.: J. Cereal Sci. 73, 130 (2017).
  59. Schär M. Y., Corona G., Soycan G., Dine C., Kristek A., Alsharif S. N. S., Behrends V., Lovegrove A., Shewry P. R., Spencer J. P. E.: Mol. Nutr. Food Res. 62, 1 (2018).

**K. Kulichová, J. Sokol, and M. Maliarová**  
*(Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, University of SS. Cyril and Methodius, Trnava, Slovakia):*  
**Study of Avenanthramides as Important Biologically Active Substances of Phenolic Nature**

Avenanthramides are biologically active substances of phenolic nature. They are present exclusively in oats where, however, their concentrations are relatively high (200 mg kg<sup>-1</sup>). Three of avenanthramides are mostly represented in the oat grains: *N*-[3',4'-dihydroxy-(*E*)-cinnamoyl]-5-hydroxyanthranilic acid (2c), *N*-[4'-hydroxy-(*E*)-cinnamoyl]-5-hydroxyanthranilic acid (2p) and *N*-[4'-hydroxy-3'methoxy-(*E*)-cinnamoyl]-5-hydroxyanthranilic acid (2f). Avenanthramides have significant biological effects, especially antioxidative, but are also interesting due to the beneficial effects in oncological diseases, in the process of atherosclerosis, inflammation, diabetes mellitus or dermatological diseases. Their interesting properties may lead to the inclusion of them in potential therapeutic drugs in the future. For this reason, the need of a study of avenanthramides as well as of the methods of their determination is increasing. In the article we provide an overview of the latest trends in the extraction and determination of avenanthramides.

Keywords: avenanthramides, biological effects, methods of determination