

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



Arbutin – biologické vlastnosti a možnosti stanovení – rešerše

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Eliška Vašutová

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala pod vedením konzultanta. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Podpis

Dne

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce, prof. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D., který mě uvedl do dané problematiky a za jeho vstřícné jednání a cenné rady a připomínky.

Obsah

1. Seznam použitých zkratk	6
2. Úvod	7
3. Cíl a zadání práce	8
4. Studovaná látka	9
4.1. Historie	9
4.2. Chemická struktura	9
4.3. Fyzikální vlastnosti	10
4.4. Stabilita	10
4.5. Toxicita	10
5. Výskyt arbutinu	11
5.1. Výskyt arbutinu v rostlinách	11
5.2. Deriváty arbutinu	12
6. Zdroje arbutinu	12
6.1. Extrakce	12
6.2. Chemická syntéza	13
6.2.1. Dvou-kroková syntéza arbutinu z glukózy	14
6.2.2. Syntéza z 2,3,4,5,6-penta-O-acetyl- β -D-glukospyranosy a 4-hydroxyfenylacetátu	15
6.3. Biosyntéza	16
6.3.1. Biotransformace pomocí enzymů	17
6.3.2. Fermentace pomocí mikroorganismů	18
7. Biologické vlastnosti	18
7.1. Působení arbutinu na syntézu melaninu	18
7.1.1. Hyperpigmentace	18
7.1.2. Tyrosináza	19
7.1.3. Syntéza melaninu	19
7.1.4. Inhibice tyrosinázy arbutinem	20
7.2. Antimikrobní vlastnosti	20
7.2.1. Využití v oblasti léčby infekcí močových cest	21
7.2.2. Infekce močových cest	21
7.2.3. Léčba infekcí močových cest	21
7.2.4. Aplikace β -arbutinu k léčbě infekcí močových cest	22
7.2.5. Mechanismus účinku	22
7.2.6. Exkrece	23
7.3. Protirakovinné účinky	23

7.3.1.	Rakovina prostaty.....	23
7.3.2.	Rakovina močového měchýře	23
7.3.3.	Rakovina kůže	24
7.3.4.	Rakovina prsu	24
7.3.5.	Rakovina děložního čípku	24
7.4.	Antioxidační aktivita	25
8.	Možnosti stanovení arbutinu vybranými analytickými metodami.....	26
8.1.	Úpravy vzorků před analýzou	26
8.2.	Separační metody.....	27
8.2.1.	Chromatografické metody.....	27
8.2.2.	Kapilární zónová elektroforéza (CZE)	31
8.3.	Spektrofotometrie.....	32
8.4.	Elektrochemické metody.....	33
9.	Závěr	36
10.	Seznam obrázků	37
11.	Seznam tabulek	37
12.	Seznam použité literatury	38

1. Seznam použitých zkratek

ASáza	Amylo-sacharáza
BR	Brittonův-Robinsonův pufr
CPE	Uhlíková pastová elektroda
CGTáza	Cyklodextrin-glykosyltransferáza
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DAD	Detektor s diodovým polem
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOPA	3-(3,4-dihydroxyfenyl) -alanin
DPV	Diferenční pulsní voltametrie
EOF	Elektroosmotický tok
GC	Plynová chromatografie
GTáza	Glykosyl-transferáza
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LD	Letální dávka
MF	Mobilní fáze
MS	Hmotnostní spektrometrie
MSTFA	Methylsilyltrifluoracetamid
SF	Stacionární fáze
SPáza	Sacharofosforyláza
TCCSUP	anaplastický přechodný buněčný karcinom krčku močového měchýře

2. Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá fenolickou bioaktivní látkou, arbutinem. V práci je zahrnut popis jeho fyzikálně-chemických vlastností, způsob vzniku, jeho syntéza a účinky na organismus, mezi které patří hlavně inhibice syntézy melaninu, jeho antioxidační a protinádorová aktivita a antimikrobní vlastnosti využívané zejména k léčbě infekcí močového traktu. Druhá část práce je věnována stanovení arbutinu v rozličných materiálech. Vedle nejpoužívanější metody stanovení pomocí HPLC je dále popsána diferenční pulzní voltametrie, kapilární elektroforéza, nebo méně častá spektrofotometrie.

3. Cíl a zadání práce

Tato rešeršní bakalářská práce má za cíl shromáždit informace o arbutinu, jeho struktuře, výskytu a zdrojích. Dále má popsat jeho biologické vlastnosti, které jsou využívány v oblastech medicíny a stručně charakterizovat možnosti jeho stanovení v rozličných materiálech, jako jsou potravinové doplňky, kosmetické přípravky a rostlinná biomasa.

4. Studovaná látka

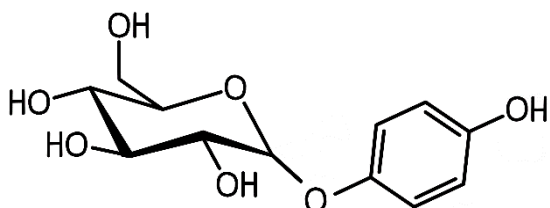
Arbutin, 4-hydroxyfenyl α -glukopyranosid, je bioaktivní látka, hydrochinonová sloučenina, která se řadí mezi glykosidy. Běžně se vyskytuje v rostlinných zdrojích, zejména pak v listech rostlin čeledi Vřesovcovité. Jedná se o farmaceuticky účinnou látku, která je již několik století využívána například v čínské medicíně, jakožto substance léčící infekce močového traktu, v moderní době se však využívá jako efektivní prostředek pro léčbu hyperpigmentace. Látka se také vyznačuje antioxidační a protizánětlivou aktivitou [1].

4.1. Historie

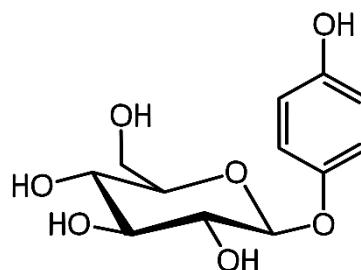
Poprvé byl arbutin izolován v roce 1852 A. Kawalierem. Jeho struktura pak byla objasněna v roce 1858 A. Streckerem, který provedl hydrolýzu za vzniku glukosy a hydrochinonu. Získání čistého arbutinu syntézou a následným šetrným přečištěním pak provedl C. Mannich. Detailní struktura arbutinu byla však objasněna až v druhé polovině 20. století s rozvojem nových metod určení struktury molekuly s využitím infračervené a UV/VIS spektroskopie, nukleární magnetické rezonance, rentgenových metod a cirkulárního dichroismu [2].

4.2. Chemická struktura

Arbutin je polární hydrochinonová látka, řadí se mezi glykosidy. Jeho molekula se skládá z hydrochinonu a D-glukosy. Mezi těmito dvěma molekulami se nachází O-glykosidická vazba. Arbutin se může ve vodných roztocích vyskytovat ve dvou izomerech: alfa a beta [3,4]. B-arbutin je látka přirozeně se vyskytující v rostlinách, zatím co α -arbutin je synteticky připravován. Oběma izomerům se připisují zdraví prospěšné biologické vlastnosti, liší se však mírou působení [5]. Například oba dokáží efektivně inhibovat aktivitu tyrozinázy, přičemž alfa arbutin je silnějším inhibitorem [3,4].



Obr. 1: Chemická struktura α – arbutinu



Obr.2: Chemická struktura β – arbutinu

4.3. Fyzikální vlastnosti

V tuhém skupenství je arbutin bílý materiál s jehličkovitou krystalickou strukturou. Je velmi dobře rozpustný ve vodě, methanolu, ethanolu, acetonitrilu a tetrahydrofuranu. Mezi rozpouštědla, ve kterých je arbutin nerozpustný, se řadí DMSO, chloroform, petrolej, diethyether a cyklohexan [6].

Jeho bod tání je v jeho stabilní formě 199,5 °C, v nestabilní 165°C. Teplota varu arbutinu je 561,6 1 °C [7].

4.4. Stabilita

Co se týče stability, arbutin je relativně stálý v extraktech s ethanolem, ve kterých je méně fotosenzitivní a nepodléhá tak rozkladu. V kosmetických přípravcích je stabilní při pH 4-8. V extraktech nebo preparátech na vodní bázi však může probíhat štěpení glykosidické vazby za vzniku hydrochinonu [8]. Hydrochinon také může vzniknout díky bakteriím na lidské kůži, které arbutin taktéž hydrolyzují [9].

Hydrochinon se stejně jako arbutin dříve využíval jako prostředek k odstranění nežádoucí hyperpigmentace. Jeho užívání mělo hned několik zdraví nebezpečných důsledků. Hydrochinon je oproti arbutinu toxičtější a na lidské buňky působí cytotoxicky. Může vyvolat alergickou reakci a jedná se o látku potencionálně vyvolávající nádorové bujení. Expozice této látky může vyvolat poškození DNA a chromozomové aberace [10].

Štěpení glykosidické vazby bývá způsobeno UV zářením, které naruší stabilitu arbutinu. Produkce hydrochinonu díky záření je tak problém, se kterým se musí počítat v oblasti kosmetických přípravků určených na potlačení hyperpigmentace, které se nanášejí na kůži a jsou často vystavovány slunečnímu svitu. V takovýchto případech je žádoucí do přípravku přidat látku, která je schopna vytvořit UV-film, například 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon-5-sulfonovou kyselinu. UV-filmem lze částečně zabránit štěpení arbutinu na nežádoucí produkt hydrochinon a tím zabránit případným nežádoucím reakcím a toxickým účinkům [9].

4.5. Toxicita

Obecně je arbutin považován jako sloučenina bezpečná pro vnější použití. Je součástí řady kosmetických přípravků, ve kterých je obsažen v bezpečných koncentracích. V několika studiích na populacích myší však byly zaznamenány jisté míry toxicity při vyšších

koncentracích. Toxicitu způsoboval aglykon hydrochinon, který způsoboval hepatotoxicitu, nefrotoxicitu a mutagenitu. Míra toxicity závisela na cestě podání, pohlaví a druhu hlodavců. Nicméně nebyla shledána toxicita v oblasti vývoje a reprodukce nebo rakovinotvorné aktivity. Arbutin tedy může vykazovat mírné toxické účinky ve značně vysokých dávkách, které byly myším a krysám orálně podávány, LD₅₀ u myší činila 9804 mg/kg, u krys 8715 mg/kg. Při zkoumání toxicity pro jejich kůži byla LD₅₀ stanovena 928 mg/kg u myší i krys.

Mnohem více studií však vyzdvihuje jeho zdraví prospěšné vlastnosti, které výrazně předčívají jeho minimální toxické účinky ve vysokých dávkách ^[11].

5. Výskyt arbutinu

5.1. Výskyt arbutinu v rostlinách

Arbutin se nachází v přírodních zdrojích, zejména pak v listech rostlin, za zmínku stojí Medvědice lékařská (*Arctostaphylos uva-ursi*) z čeledi Vřesovcovité (*Ericaceae*) a také zástupci z čeledi Lomikamenovité (*Saxifragaceae*). Ke dnešnímu dni byla tato sloučenina nalezena v cca 50 čeledích rostlin ^[11].

Kromě listů se arbutin nachází také v jiných částech rostlin, například významný podíl arbutinu byl nalezen v kůře a pupenech hrušní odrůd 'Clapova', 'Konference', 'Williamsova červená', 'Williamsova', 'Charneuská', 'Lucasova', 'Highland', 'Grasdemange', 'Thirriotova' a 'General Leclerc'. Míra výskytu arbutinu v plodech je oproti zmiňovaným materiálům mnohem menší. Množství arbutinu a dalších stanovovaných látek s antioxidační aktivitou, jako byly například kyselina chlorogenová a rutin, se odvíjelo od vegetační periody, ve které byl materiál ze stromů sbírán. Koncentrace těchto látek v biomase těchto stromů je mnohonásobně vyšší než v jejich plodech. Biomasa z ovocných stromů je dosud nevyužívána jakožto zdroj bioaktivních, m.j. arbutinu, a tak představuje jeho potenciální zdroj ^[3].

Ve fytoterapii se výtažky z Medvědice lékařské, které obsahují arbutin, využívají již po staletí. Jeho množství v přírodninách je různorodé, závisí na vegetačním období rostliny nebo na technice a teplotě sušení. Ačkoliv jsou arbutin a jeho deriváty dostupné z výše zmíněných zdrojů, jejich extrakce z rostlinných materiálů je v důsledku větší spotřeby a využití nahrazováno chemickou a biotechnologickou syntézou ^[12].

5.2. Deriváty arbutinu

Arbutin se v rostlinách vyskytuje jak ve své volné formě, tak ve formě esterů nebo etherů. Mezi tyto deriváty patří například methylarbutin, deriváty arbutin galloylu v Medvědicí lékařské, 6'-O-(3,4-dihydroxycinnamoyl arbutin) v listech *Cenestis ferruginea* z čeledi Kaparovité, 6'-E-(2-methyl-2-buteonyl) arbutin a 6' -(2,5-dihydroxycinnamoyl) arbutin, které obsahovaly listy *Heliciopsis lobata*.

Mezi syntetické deriváty se řadí například deoxyarbutin, který stejně jako jeho hydroxylovaná forma dokáže inhibovat aktivitu tyrozinázy, a to dokonce efektivněji. Jeho nevýhodou je menší fotostabilita ve vodných roztocích, kde se na hydrochinon rozkládá rychleji než arbutin [9].

6. Zdroje arbutinu

Arbutin lze získat jak z přírodních zdrojů, tak de novo syntézou. Z rostlinných materiálů lze arbutin získat pomocí extrakce zejména organickými rozpouštědly. Umělou přípravu arbutinu pak dělíme do dvou kategorií: Chemická syntéza a biosyntéza, pod kterou spadají metody enzymové katalýzy. Enzymatická syntéza může probíhat za pomoci enzymových extraktů z rostlin, nebo fermentací pomocí upravených mikroorganismů. Postupy získávání této bioaktivní látky jsou popsány níže [13].

6.1. Extrakce

Nejstarším způsobem získávání arbutinu, spolu s jinými bioaktivními látkami obsaženými v rostlinných zdrojích, je extrakce. Získaný výtažek pak neobsahuje pouze čistý arbutin, ale další komponenty, které daná část extrahovaného rostlinného materiálu obsahuje [8].

Pro dosažení co nejvyšší účinnosti se volí ultrazvuková extrakce. Rostlinné části se podrobí sušení při pokojové teplotě, po vysušení se materiál homogenizuje. Podle typu extrahovaného materiálu se volí rozpouštědlo, často voda a ethanol nebo methanol v různých poměrech. Čas volený u ultrazvukové extrakce bývá v rozmezí 10-30 minut, frekvence ultrazvuku okolo 20-40 kHz a 400 W. Teplota obecně zvyšuje rozpustnost látek obsažených v

rostlinách, má zásadní roli na přechod látek do extrakčního média a bývá většinou v rozmezí od 25 do 80 °C [12].

Na efektivitě ultrazvukové extrakce se podílí ultrazvukové vlny, díky kterým se v kapalině formují bublinky plynu, které se následně zbortí do sebe a tím vytváří změny teploty a tlaku na jejich místě [14]. Dochází pak k procesu kavitace, při kterém se značně naruší buněčná membrána a bioaktivní látky snáze a rychleji prostupují do rozpouštědel. Pomocí ultrazvuku se tak výrazně snižuje čas extrakce, ale také spotřeba rozpouštědel [15]. Další výhodou je použití méně škodlivých látek a větší výtěžnost. Při ultrazvukové extrakci lze také pracovat při laboratorní teplotě, což umožňuje rychlejší extrakci termolabilních látek [16].

Všechny tyto parametry závisí na původu a typu materiálu, ze kterého se arbutin a spolu s ním i jiné sloučeniny extrahují. Po extrakci následuje přefiltrování produktu od přebytečné drti [12].

Výše zmíněné typy materiálu, listy, plody, slupky plodů a větve, mají různý obsah arbutinu a bylo taktéž zjištěno, že materiály s větším povrchem, listy, slupky a větve, jsou na arbutin bohatější [12]. Extrakcí a následnou separací arbutinu od ostatních komponent výtažku lze získat pouze v přírodě se vyskytující izomer, β -arbutin.

6.2. Chemická syntéza

Produkce arbutinu chemickou syntézou je v základě zprostředkována reakcí glukózy s prostetickou skupinou, která reaguje s hydrochinonem. Katalyzovanou glykosylací se tyto dvě komponenty spojí za současného odštěpení prostetické skupiny nacházející se na glukóze.

Chemické reakce vedoucí ke vzniku arbutinu můžeme rozdělit do dvou kategorií:

Koenigsova–Knorrova syntéza, při které reaguje glykoshalogenid (nejčastěji bromid, v případě arbutinu pak glukosbromid) s alkoholem nebo fenolem, aglykonem hydrochinonem. Tyto reakce probíhají v alkalickém prostředí. Jako příklad tohoto způsobu přípravy je níže uvedena dvou-kroková syntéza arbutinu z glukosy.

Druhým způsobem je Helferichův způsob, kdy se na glukóze nachází O-acylová skupina. Následnou reakcí s alkoholem nebo fenolem za katalýzy sloučenin charakteru Lewisových kyselin, nebo organických bazí, jako například trifluorbromid ether, které jsou schopny zajistit

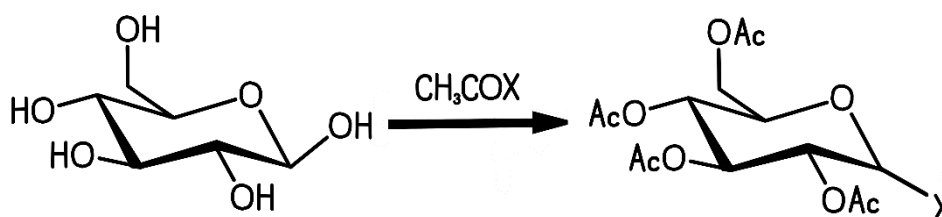
stereospecifitu reakce. (Tzv. Helferich glykosylace princip). Níže je uvedena syntéza z β -D-glukosypentacetátu a 4-hydroxyfenylacetátu [1, 17].

6.2.1. Dvou-kroková syntéza arbutinu z glukózy

Jako výchozí látka pro syntézu arbutinu byla použita glukosa. Při syntéze lze připravit dva meziprodukty: 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -glykopyranosyl chlorid nebo 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -glykopyranosyl bromid. Následnou reakcí těchto dvou složek s hydrochinonem v druhém kroku vzniká arbutin.

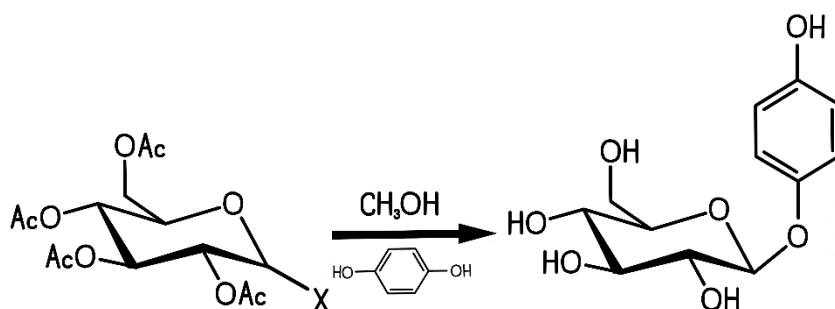
2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -glykopyranosyl chlorid se připraví reakcí acetylchloridu a β -D-glukosy v baňce s kulatým dnem a třemi tubusy. Směs se promíchává při pokojové teplotě, která by neměla překročit 25 °C. Po 16 hodinách vzniká žlutý roztok, ke kterému se přidá chloroform a směs se nalije do chladné vody. Organická vrstva se oddělí, třikrát promyje vodou a následně se vysuší chloridem vápenatým. Získaný filtrát je odpařen za sníženého tlaku a vzniká bílý 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -glykopyranosyl chlorid. Reakce je snadná a její výtěžnost je 71,8 %.

2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -glykopyranosyl bromid lze připravit v baňce s kulatým dnem a třemi tubusy, na které je přídavná byreta. Reakce probíhá za chlazení v ledové lázni. β -D-glukosa se rozpustí ve chloroformu, k tomuto roztoku se za stálého a intenzivního míchání přidá po kapkách z byrety acetylchlorid a reakční směs se poté 3 hodiny míchá při teplotě -10 °C. Touto reakcí vzniká bezbarvý jehličkovitý krystaloidní roztok 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -glykopyranosyl bromidu. Oproti předchozí reakci byla tato syntéza více bouřlivá. Výtěžnost je 79,3 %.



Obr.3: Reakce acetylhalogenidu a β -D-glukosy, vzniká 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -glykopyranosyl

Samotná reakce těchto dvou meziproductů, 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -glykopyranosyl bromidu či chloridu, na arbutin probíhá taktéž v baňce s kulatým dnem s přidavnou byretou. K tetra-O-acetyl- α -glykopyranosyl bromidu nebo chloridu se přidá hydrochinon, tato směs se rozpustí v čistém bezvodém methanolu. Výtěžnost reakce je závislá na pH, největší výtěžnost byla zaznamenána při pH = 9,5-10,0, proto je nutno přidat 5% roztok CH_3ONa v methanolu. Směs se následně 2 hodiny míchá při pokojové teplotě a po ukončení reakce se odpaří methanol, který sloužil jako rozpouštědlo. Arbutin se následně chromatograficky separuje [17].

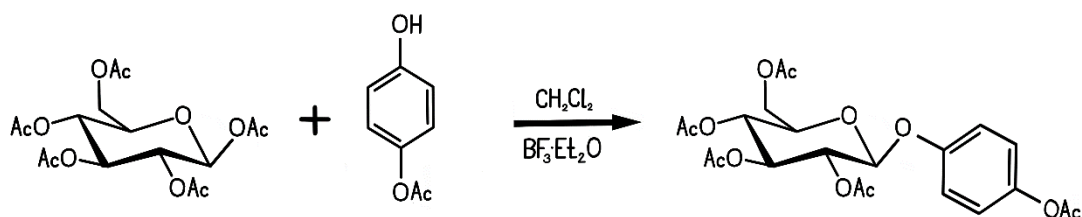


Obr.4: Reakce 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -glykopyranosyl halogenidu s hydrochinonem za vzniku arbutinu

6.2.2. Syntéza z 2,3,4,5,6-penta-O-acetyl- β -D-glukospyranosy a 4-hydroxyfenylacetátu

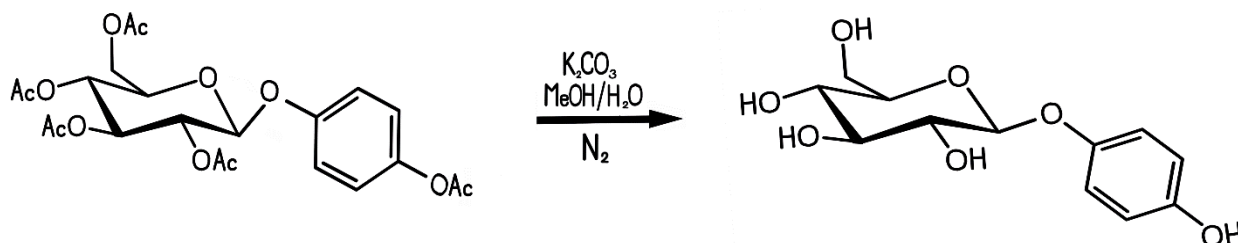
Tato syntéza taktéž probíhá ve dvou krocích, kdy při prvním kroku je připraven 2,3,4,5,6-penta-O-acetyl- α , β -arbutin a při druhém kroku byly odstraněny chránící skupiny na glukose. K výchozím látkám, 2,3,4,5,6-penta-O-acetyl- β -D-glukospyranosy a 4-hydroxyfenylacetátu, je přidán bezvodý dichlormethan a roztok diethylether fluoridu bromitého, který v reakci slouží jako katalyzátor. Reakční směs se 72 hodin inkubuje, následně se schladí a po přidavku nasyceného vodného roztoku NaHCO_3 se 1 hodinu intenzivně míchá.

Po ukončení reakce se oddělí organická vrstva od organické, vodná frakce se extrahuje do dichlormethanu. Organické frakce se vysuší pomocí Na_2SO_4 , přefiltrují a odpaří. Tímto procesem vzniká meziproduct 2,3,4,5,6-penta-O-acetyl- β -arbutin. Penta-O-acetyl- α -arbutin se připraví stejným postupem jako 2,3,4,5,6-penta-O-acetyl- β -arbutin, ovšem místo 2,3,4,5,6-penta-O-acetyl- β -D-glukospyranosy je použita 2,3,4,5,6-penta-O-acetyl- α -D-glukospyranosa.



Obr. 5: Reakce 2,3,4,5,6-penta-O-acetyl- β -D-glukospyranosy a 4-hydroxyfenylacetátu za vzniku 2,3,4,5,6-penta-O-acetyl- β -arbutinu.

Pro přípravu α a β arbutinu pokračujeme rozpuštěním vzniklých meziproductů ve vodném roztoku methanolu s přidavkem K_2CO_3 . Reakční směs se míchá za pokojové teploty pod dusíkovou atmosférou 24 hodin. Poté se po kapkách přidává koncentrovaná kyselina sírová.



Obr. 6: Reakce 2,3,4,5,6-penta-O-acetyl- β -arbutinu ve vodném roztoku methanolu s přidavkem K_2CO_3 za vzniku β -arbutinu

Reakční směs se následně odpaří do sucha, tuhý produkt se extrahuje do vroucího ethylacetátu a organická frakce se opět odpaří, tentokrát za sníženého tlaku. Vzniklý arbutin se poté rozpustí v ethylacetátu a rekrystalizuje se za vzniku jehličkovitých krystalků ^[1].

6.3. Biosyntéza

Jelikož je arbutin stále více hojněji využíván převážně v kosmetických přípravcích určených pro léčbu hyperpigmentace, požadavky na jeho požadované množství neustále stoupají. Získávání arbutinu extrakcí je drahé, jelikož rostliny neobsahují až tak vysoký podíl arbutinu a také je mnohdy zapotřebí použít velké množství rozpouštědel.

Chemická syntéza, kde dominuje Helferigova metoda není dostatečně selektivní v rámci izomerie. Navíc se při chemické syntéze pracuje se zdravím škodlivým hydrochinonem a je důležité dodržet často striktní podmínky reakce ^[18].

Arbutin může být produkován pomocí rostlinných enzymů, které jako své substráty využívají sacharidy, které jsou následně napojeny na glykosylační akceptor, exogenně suplementovaný hydrochinon ^[19]. Kromě rostlinných enzymů lze stejného efektu dosáhnout pomocí modifikovaných mikroorganismů, které jsou také schopny, díky své enzymatické výbavě, arbutin produkovat ^[13].

Metody enzymové katalýzy oproti produkci arbutinu chemickou syntézou sčítají několik výhod: tento způsob je šetrný vůči životnímu prostředí, podmínky reakcí jsou klidnější, čímž se snižují i požadavky na energie (odpadá zahřívání, chlazení reakčních směsí), reakce probíhají rychleji a jsou více specifické ^[13,20].

6.3.1. Biotransformace pomocí enzymů

Enzymy jsou makromolekulární proteiny, které katalyzují reakce v živých organismech. Lze je využít k syntéze širokého spektra látek a produkce arbutinu enzymovou katalýzou se řadí mezi více šetrné způsoby jeho získávání. Mezi hlavní enzymy využívané při produkci arbutinu se řadí glykosyltransferázy, sacharofosforylázy, cyklodextrin-glykosyltransferázy, amylosacharázy. Dále lze využít enzymů α -glukosidázy, α -amylázy a dextran-sacharázy ^[13]. Enzymy se získávají z rostlinných extraktů, které pocházejí z již vyvinutých rostlin, nebo z jejich naklíčených semen. Přídavkem vhodných substrátů pak vzniká arbutin ^[2].

Glykosyltransferázy (GTázy) katalyzují vznik O-glykosylové vazby mezi glykosylovým zbytkem, který pochází z aktivovaného glykosylového donoru, a molekulou glykosylového akceptoru. Tento typ enzymů je hojně využíván při produkci různých typů derivátů cukrů v chemickém, farmaceutickém i potravinářském průmyslu. ^[20] Jako donor glykosylové části molekuly slouží například sacharóza, škrob, UDP-glukóza a UDP-galaktóza ^[19].

Sacharofosforylázy (SPázy) dokáží přenést fosforylovanou molekulu glukózy nebo glukózových skupin utvořených rozkladem sacharózy na místa produkce α -arbutinu. Díky tomuto enzymu, pocházejícího z *Leuconostoc mesenteroides*, byl v roce 1994 poprvé syntetizován α -arbutin. V důsledku složitých regulačních mechanismů v metabolismu tohoto enzymu jsou však výtěžky velmi malé.

Cyklodextrin-glykosyltransferázy (CGTázy) jsou extracelulární enzymy, které katalyzují rozklad škrobu a planárních maltodextrinů na cyklodextriny. Následně katalyzuje

transglykosylaci molekul. Pro vznik arbutinu CGTáza katalyzuje transglykosilaci hydrochinonu na maltodextrin nebo cyklodextrin.

Amylosacharáza (ASáza) je transglykosyláza, která jako donor glukózy využívá pouze disacharid sacharózu. Co se syntézy arbutinu týče, má tento enzym velice vysokou výtěžnost. Výtěžek však snižuje oxidace hydrochinonu, která je zabraňuje průběhu katalyzované reakce. Oxidaci hydrochinonu lze zabránit přidávkem antioxidantů (například kyseliny askorbové) do reakční směsi a tím zvýšit výtěžnost syntézy ^[13].

6.3.2. Fermentace pomocí mikroorganismů

Produkování arbutinu fermentací pomocí mikroorganismů nabízí oproti chemické syntéze bezpečnější a ekonomicky výhodnější cestu, jak arbutin získat. K fermentaci se používají mikroorganismy, do kterých jsou vloženy plazmidy. Takto modifikované mikroorganismy po insertu plazmidu jsou schopny ve větší míře vytvářet enzymy, potřebné na utilizaci výchozích látek a jejich následné přeměny na výsledný produkt arbutin.

Kolonie se podrobí kultivaci na agarech a následně jsou přeneseny do fermentačního média, které kromě substrátu zajišťujícího zdroj uhlíku obsahují i pomocné látky, které tvoří příznivé podmínky a prostředí fermentace, která může probíhat v protřepávaných nádobách, nebo v režimu podávaných dávek, kdy jsou substráty kontinuálně a pomalu přidávány do fermentační nádoby s mikroorganismy. Fermentace probíhá za teploty 33 °C, za určitých podmínek se mohou přidat i antimikrobní látky, kterými lze koordinovat růst kolonií ^[18].

7. Biologické vlastnosti

7.1. Působení arbutinu na syntézu melaninu

Mezi hlavní oblasti využití arbutinu patří léčba hyperpigmentace, která je způsobena nadměrnou aktivitou melanocytů či jinými poruchami tvorby melaninu. Arbutin je bezpečnější náhradou za dříve hojně používaný hydrochinon, aglykon arbutinu, ke kterému se však vztahuje řada nežádoucích účinků ^[12].

7.1.1. Hyperpigmentace

Hyperpigmentace je výsledkem nadměrné produkce pigmentu melaninu v lidské pokožce. Na vzniku abnormalit v produkci melaninu se může podílet hned několik faktorů, řadí

se mezi ně nadměrná expozice UV záření, vystavení se některým chemickým látkám, užívání určitých léků, působením mediátorů zánětu nebo nemoci spojované s poruchou hormonální rovnováhy [6]. Tyto faktory mohou vyústit v nadměrnou aktivitu melanocytů, která je ve většině případů nežádoucí [21].

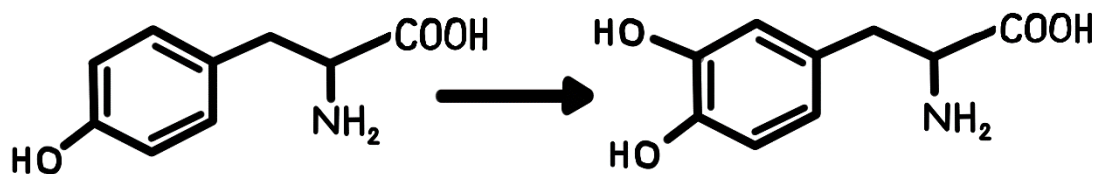
Vnější faktory však nejsou jediné, které vznik melaninu ovlivňují. Důležitou úlohu ve vlastním vzniku hyperpigmentace hraje klíčový enzym melanogeneze, tyrosináza, která katalyzuje první dva kroky syntézy hnědočerného pigmentu melaninu [22].

7.1.2. Tyrosináza

Tyrosináza je proteinový komplex, enzym, který se řadí se mezi oxidázy. Jedná se o bifunkční metalloenzym s dvěma atomy mědi, nacházejícími se v jeho aktivním místě [6]. Je přítomen v membráně melanosomů, které se nacházejí v melanocytech, buňkách, které jsou zodpovědné za syntézu melaninu. Tyto buněčné organely jsou pro melanocyty specifické. Enzym vzniká na úrovni endoplazmatického retikula, následně je přenesen pomocí Golgiho aparátu do melanosomů, kde probíhá syntéza melaninu. Tyrosináza katalyzuje první dvě reakce při syntéze melaninu [23].

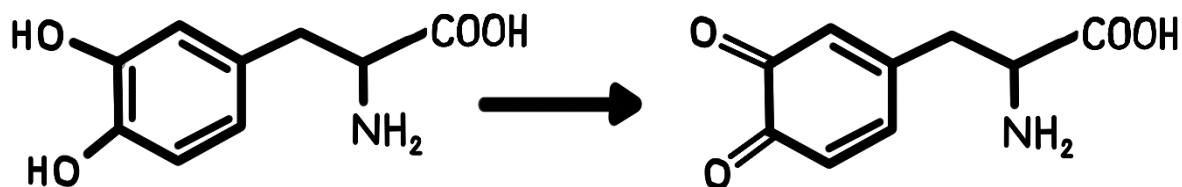
7.1.3. Syntéza melaninu

První reakcí melanogeneze, katalyzovanou klíčovým enzymem tyrosinázou, je hydroxylace tyrosinu za vzniku produktu 3-(3,4-dihydroxyfenyl) -alaninu – DOPA, startovní produkt syntézy melaninu [24].



Obr. 7: Reakce vzniku DOPA hydroxylací tyrosinu působením tyrosinázy

Druhou reakcí, katalyzovanou tyrozinázou je oxidace DOPA za vzniku dopachinonu, který je sérií dalších reakcí přeměňován až na konečné produkty – Feomelanin a eumelanin [25].



Obr. 8: Reakce vzniku dopachinonu oxidací DOPA působením tyrozinázy

7.1.4. Inhibice tyrozinázy arbutinem

Arbutin je inhibítozem klíčového enzymu melanogeneze, tyrozinázy. Vratně se váže na tyrozinázu a tím inhibuje její aktivitu. Zabraňuje tak oxidaci L-tyrosinu a vzniku DOPA [9].

Struktura aktivního místa tyrozinázy je tvořena šesti histidinovými zbytky, které koordinují dva atomy mědi a tvoří substrát-vázací kapsu. Substrát je v aktivním místě držen pomocí π - π interakcí. V této kapse probíhá hydroxylace monofenolů za vzniku ortho-difenolů, tato aktivita se nazývá monofenolázová. Druhá reakce dává vzniku orto-chinonům ze dříve vzniklých ortho-difenolů, tuto aktivitu nazýváme difenolázovou [25].

Arbutin se na místo tyrosinu vratně naváže do aktivního místa a znemožní tak jeho oxidaci. Mechanismus této inhibice je kompetitivní, arbutin tedy soutěží o vazebné místo na enzymu se substrátem, tyrosinem [9]. Synteticky připravený α -arbutin je až 10x silnějším inhibítozem tyrozinázy, než jeho přirozeně se vyskytující izomer β -arbutin, jenž nalézáme v rostlinách [5,20]. Na rozdíl od jiných depigmentačních prostředků, arbutin přímo nezasahuje do potlačení syntézy enzymu, tedy do jeho genové exprese, ale pouze do snížení enzymové aktivity tyrozinázy [26].

7.2. Antimikrobní vlastnosti

Jako další farmakologický efekt arbutinu jsou udávány jeho antimikrobní vlastnosti. Sám arbutin má antimikrobní vlastnosti, navíc se hydrolytickým štěpením rozkládá na aglykon hydrochinon, kterému jsou také připisovány antimikrobní a antiseptické účinky [27].

7.2.1. Využití v oblasti léčby infekcí močových cest

Za pravděpodobně nejstarší způsob využití arbutinu se považuje aplikace při infekcích močového traktu. Využití výtažků z Medvědice lékařské s obsahem arbutinu, který vykazuje protizánětlivé, antimikrobní a antioxidační účinky, se jeví jako efektivní a šetrný způsob, jak je možno se s těmito problémy vypořádat [2].

7.2.2. Infekce močových cest

Infekce močového cest je zánětlivým onemocněním, při které dochází ke kolonizaci močového traktu mikroorganismy. Nejčastějšími původci těchto typů onemocnění jsou gram-negativní bakterie z rodu *Enterobacteriaceae*, kterými jsou *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter* a *Enterobacter*, dále bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* a *Enterococcus faecalis* [28].

Infekci močového traktu však můžou způsobit i gram-pozitivní bakterie a některé druhy hub. Infekci způsobí vniknutí některého ze zmiňovaných mikroorganismů do močové trubice, močového měchýře, v některých případech agens proniká až do močovodu a ledvin. Infekce bývá častější u žen, než u mužů, to je zapříčiněno kratší délkou močové trubice, tudíž mikroorganismy snáze proniknou do močového traktu a jsou schopny jej kolonizovat.

Na vzniku infekcí močového traktu se podílí několik dalších faktorů, řadí se mezi ně pohlavní styk, používání katetru při hospitalizacích nebo špatné sociální podmínky. Tyto infekce jsou také spojovány s kouřením, které je dále vázáno na vznik rakoviny močového měchýře, nádorové onemocnění, které je také spojeno s vyšším výskytem infekcí močových cest. U žen navíc přispívá nesprávné používání menstruačních pomůcek a postmenopauzní pokles hormonu estrogenu, který způsobuje změny vaginální mikroflóry. U mužů jsou infekce močových cest asociovány s prostatitidou, zánětem prostaty, benigní hyperplázií prostaty a dalšími obstrukcemi močových cest [29].

7.2.3. Léčba infekcí močových cest

Infekce močového traktu v určitých případech samovolně vymizí. Málo komplikované infekce můžou být léčeny pomocí diuretik a rostlinných přípravků, obsahující látky s antimikrobními vlastnostmi. Nejpoužívanější přípravky pocházejí z Medvědice lékařské s minimálním obsahem arbutinu daným jako 7,0 % [30].

Často se však volí cesta léčby pomocí antibiotik. Tento způsob však skrývá několik úskalí, díky kterým je žádoucí, aby byla tato léčba nahrazována alternativami. Jedním z důvodů je antibiotická rezistence, stále narůstající problém, který se společnost snaží eliminovat správně cílenou terapií. Užívání antimikrobních látek může způsobit narušení střevní nebo vaginální mikroflóry [29]. Dalším problémem častého užívání antibiotik je nefrotoxicita, díky které dochází k poškození funkcí ledvin [28].

7.2.4. Aplikace β -arbutinu k léčbě infekcí močových cest

Výtažky z Medvědice lékařské se v oblasti léčby močových cest využívají již několik století [30]. Tato rostlina může být použita ve formě čajů ze sušených listů, tinktury, výtažku, nebo tuhého práškového přípravku. Hlavními cíli terapie jsou infekce močového traktu způsobené mikroorganismy, kterými jsou *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*. Studie dokazují, že užívání těchto extraktů, v nichž je arbutin majoritní složkou, je bezpečný a efektivní způsob, jak předcházet infekci močových cest, stejně tak jak léčit již probíhající mikrobiální napadení. Arbutin vykazuje také diuretické účinky, které mohou být při léčbě infekcí močových cest také nápomocné [31].

Léčba infekcí močového traktu samotným arbutinem je méně efektivní než léčba výtažkem z Medvědice lékařské. Tento výtažek totiž obsahuje flavonoidy, mezi nimi kyselinu gallovou, která zabraňuje rozpadu arbutinu [30].

Moč po užívání výtažku z této rostliny, který má vysoký obsah arbutinu, vykazuje větší bakteriostatické účinky než normální moč. Arbutin má antimikrobní aktivitu, která je efektivnější při alkalickém pH moči, okolo hodnoty 8. Alkalizace moči tak může přispět k vyšší efektivitě léčebného účinku arbutinu [27].

7.2.5. Mechanismus účinku

Obě látky, arbutin i hydrochinon, narušují buněčnou stěnu a membránu bakterií. Buněčná membrána je protektivní bariérou bakterií a při jejím narušení dochází k úniku intracelulárního obsahu mikroorganismu, který není schopen přežít [32].

Po perorálním podání se arbutin vstřebává v tenkém střevě. V játrech je pak hydrolyzován β -glukosidázou za vzniku hydrochinonu, který je následně konjugován s kyselinou glukuronovou nebo sírovou. V těchto formách je pak vylučován ledvinami. Pokud v močovém traktu probíhá infekce, konjugáty hydrochinonu jsou v močovém měchýři štěpeny

zpět na hydrochinon, který má antimikrobní vlastnosti [33]. Ačkoliv má sám arbutin antimikrobní vlastnosti, hydrochinon má antimikrobní aktivitu výrazně větší. Lze tak říci, že antimikrobní aktivita arbutinu je přímo úměrná aktivitě enzymu β – glukosidázy [34].

7.2.6. Exkrece

Po rozštěpení arbutinu dochází k dalším modifikacím vzniklého hydrochinonu v játrech. Nejčtenější sloučeninou, která je v moči po podání přípravku s obsahem arbutinu přítomna je hydrochinon konjugovaný s kyselinou glukuronovou, reakce probíhá pomocí enzymu β -D-glukuronidázy. Kromě konjugátu s glukuronovou kyselinou se hydrochinon vylučuje i jako hydrochinon sulfát. Po čtyřech hodinách se vyloučí více než polovina podaného množství arbutinu a po dvaceti čtyřech hodinách se vyloučí více než 75 % dávky v příslušných konjugátech [30,31].

7.3. Protirakovinné účinky

Vedle účinků v oblasti řešení hyperpigmentace, které byly známy alespoň po posledních sedmdesát let, se stále více uvažuje nad využitím arbutinu v potlačení vzniku rakoviny, jelikož arbutin vykazuje cytotoxické působení proti několika lidským rakovinným a nádorovým buněčným liniím. Většina experimentů, které měly za cíl dokázat protirakovinné účinky arbutinu, byly prováděny in vitro, u některých případů byly prokázány mechanismy působení, kterými arbutin potlačuje nádorové bujení [11].

7.3.1. Rakovina prostaty

Bylo prokázáno, že arbutin indukuje apoptózu rakovinných buněk, je schopen snížit množství reaktivních kyslíkových sloučenin a zvýšit expresi genů, které dávají vzniku prozánětlivým interleukinům a tumor nekrotizujícímu faktoru alfa. Těmito prostředky byl schopen arbutin snížit viabilitu buněčných linií rakoviny prostaty, avšak aktivita arbutinu, popřípadě jeho analogů, proti buněčným liniím rakoviny prostaty in vitro, jakožto potenciální prostředek terapie tohoto typu rakoviny, musí být blíže prozkoumána [11].

7.3.2. Rakovina močového měchýře

Rakovina močového měchýře je nádorové onemocnění, které se vyznačuje nádorovým bujením v tkáni měchýře. Pro studii zkoumající účinek arbutinu na tento typ nádoru byly využity buněčné linie lidského močového měchýře TCCSUP (anaplastic transitional cell carcinoma in the neck of the urinary bladder – anaplastický přechodný buněčný karcinom

krčku močového měchýře). U koncentrací menších než 500 mg/ml arbutin sice neměl přímé cytotoxické účinky proti této buněčné linii, avšak výrazně snížil jejich proliferaci v závislosti na čase a koncentraci. Arbutin také narušil buněčný cyklus těchto buněk a inaktivoval extracelulární signálem-regulovanou kinázu, která funguje jako vnitřní regulátor buněčné proliferace. Předpokládalo se, že by arbutin mohl také narušovat buněčný cyklus up-regulací cyklin-dependentního inhibitoru kinázy p21 ^[11].

7.3.3. Rakovina kůže

Zkoumán byl také i vztah arbutinu k buňkám maligních melanomů. Studie ukázala, že arbutin je schopen navodit změny v expresi genů, z nichž některé jsou zodpovědné za kódování 26 proteinů. Proteiny s pozměněnou strukturou vykazovaly rozličné funkce, měly však důležitou roli v oblasti regulace buněčné proliferace, diferenciaci, apoptózy a imunitních odpovědí. Tyto proteiny mají výraznou roli v potlačení dalšího vývoje melanomu a tak aplikace arbutinu může vést k supresi tvorby tumoru z rakovinných buněk ^[27].

7.3.4. Rakovina prsu

Rakovina prsu se řadí mezi nejčastější typ rakoviny u žen, léčba běžně probíhá pomocí chemoterapie a radioterapie. Při hledání přírodních produktů, které by mohly léčbě napomoci, se prosadil methanolvý extrakt z Pastaly Rozkladité (*Turnera diffusa*), který arbutin obsahoval, vedle něj se v extraktu nacházel i flavon apigenin. Tento extrakt vykazoval cytotoxicitu vůči nádorovým buňkám, které likvidoval cestou apoptózy. Byly posouzeny také účinky čistého arbutinu proti buněčným liniím lidské rakoviny prsu a cytotoxicita byla prokázána i u něj. Mechanismem účinku nebyla pouze indukce apoptózy, ale také zánětlivá reakce a genotoxicita. Avšak při nízkých koncentracích se vyskytl opačný efekt. Namísto indukce se vyskytla inhibice apoptózy a tím se podpořil růst a přežívání nádorových buněk ^[11].

7.3.5. Rakovina děložního čípku

Rakovina děložního čípku je v dominantním množství případů způsobena infekcí lidským papillomavirem. Tento typ rakoviny je nejčastější u mladých žen, které ještě nedovršily čtyřiceti pěti let. Stejně jako u rakoviny prsu, i u tohoto typu rakoviny byl testován methanolvý extrakt z Pastaly Rozkladité (*Turnera diffusa*), který měl značný obsah arbutinu. Cytotoxicita byla testována proti buněčným kulturám rakoviny děložního čípku, jak HPV pozitivních, tak HPV negativních.

Cytotoxický efekt proti nádorovým buňkám děložního čípku byl výrazný než proti nádorovým buňkám testovaných u rakoviny prsu. Čistý arbutin pak vykazoval antiproliferační aktivitu proti těmto buněčným liniím, avšak experimenty neobjasnily mechanismy, kterými arbutin proti buněčným liniím rakoviny děložního čípku působí [11].

7.4. Antioxidační aktivita

Antioxidanty jsou látky, které jsou schopny neutralizovat volné radikály, které na organismus nemají příznivé účinky a přispívají k oxidačnímu stresu, který je způsoben nepoměrem pro-oxidačních činitelů a antioxidantů [35]. Reaktivní kyslíkové sloučeniny vznikají neúplnou redukcí kyslíku. Mají důležitou funkci v regulaci fyziologických procesů napříč celým organismem, avšak jejich nadprodukce může navodit oxidativní stres, který je podkladem pro řadu chorobných stavů, mezi něž patří například nádorové bujení nebo neurodegenerativní onemocnění [36].

Arbutin má velice rozmanitou antioxidační aktivitu a ve srovnání s hydrochinonem navíc nepůsobí cytotoxicky, což je jeho hlavní předností, i přes to, že proti určitým typům reaktivních kyslíkových sloučenin a volným radikálům je jeho antioxidační účinek, v porovnání s hydrochinonem slabší. Arbutin se pomaleji, avšak dlouhodoběji, vypořádával s 2,2'-azobis (2-methylpropionamidin)dihydrochlorid peroxylovými radikály, které způsobují hemolýzu erytrocytů. Arbutin tuto hemolýzu dokáže potlačit efektivněji než hydrochinon. Ve vyšších koncentracích arbutin chrání kožní fibroblasty před účinky těchto radikálů, zatímco hydrochinon vykazoval cytotoxicitu.

Arbutin utlumil oxidativní stres, který byl navozen tetrabutylhydroperoxidem při lidské rakovině jater HepG2 buněčné linie a lidské rakovině prostaty LNCap buněčné linie. Genomická analýza provedena Natalíí Polouliakh a kolektivem^[4] prokázala, že v lidských kožních fibroblastech po aplikaci α -arbutinu byly přítomny transkripční faktory s eventuální funkcí v oblasti hojení ran, odpovědi na toxicitu a útlumu nádorového bujení. α -arbutin také navodil vyšší expresi Nrf2 transkripčního faktoru, který dále aktivuje cílové geny podílející se na antioxidační aktivitě.

Při vlastní syntéze melaninu vznikají reaktivní kyslíkové sloučeniny, přesněji hydroxylové radikály, vznikající při oxidaci L-tyrosinu a L-DOPA katalyzovanou tyrosinázou. Ukázalo se, že arbutin je schopen při obou reakcích snížit množství produkovaných

intracelulárních hydroxylových radikálů a tím předcházet ztrátě membránového potenciálu mitochondrií. Tyto příklady antioxidační aktivity poukazují na fakt, že arbutin je schopen ovlivňovat množství reaktivních kyslíkových sloučenin, a to přímým vychytáváním radikálů, které vznikají při samotné syntéze melaninu, nebo nepřímým působením na ovlivnění antioxidační kapacity buněk díky aktivaci transkripčních faktorů souvisejících s antioxidační aktivitou ^[4].

8. Možnosti stanovení arbutinu vybranými analytickými metodami

Arbutin, jakožto bioaktivní látka vyskytující se v přírodních materiálech, je součástí kosmetických přípravků a také v menší míře i potravinových doplňků. Stanovení přesného obsahu sledované látky v těchto přípravcích je tedy v zájmu bezpečnosti v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Je také žádoucí stanovit obsah této látky v přírodních zdrojích, ze kterých se následně arbutin získává.

V této části práce je zmíněno několik příkladů metod stanovení arbutinu v rostlinách, kosmetických přípravcích a potravinových doplňcích.

8.1. Úpravy vzorků před analýzou

Před samotnou analýzou je v mnoha případech vhodné provést úpravy vzorků, díky kterým bude možno provést analýzu. Pomocí těchto kroků lze analýzu zrychlit, také dosáhnout větší výtěžnosti, a především zvýšit selektivitu stanovení odstraněním balastních složek z matrice. Mezi hlavní úpravy vzorků v případě analýzy arbutinu patří extrakce arbutinu a jeho následná derivatizace. Těmito úpravami lze minimalizovat matricové efekty, které negativně ovlivňují níže zmíněná stanovení ^[37]. Derivatizace se provádí pro úpravu vlastností analytu, například pro zvýšení těkavosti nebo pro zajištění odezvy detektoru. Extrakcí se nejčastěji arbutin převede do vodného roztoku methanolu či do destilované vody.

Jednotlivé kroky úpravy vzorku před jednotlivými analýzami jsou popsány u každé z popisovaných metod.

8.2. Separační metody

Separační metody jsou postupy, při kterých dochází k dělení jednotlivých komponent směsi na základě odlišných chemických a fyzikálních vlastností. Obvykle tak dochází na základě rozdělení mezi dvě nemísitelné fáze. Mezi separační metody, kterými lze arbutin stanovit, řadíme především chromatografii a kapilární zónovou elektroforézu. Oba způsoby jsou popsány níže.

8.2.1. Chromatografické metody

Chromatografické metody se řadí mezi hojně používané způsoby stanovení arbutinu a dalších bioaktivních látek. Jedná se o separační metody, u kterých dochází k rozdělování látek na základě neustálého ustalování rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými fázemi a látkami, které se separují. Nemísitelnými fázemi jsou fáze stacionární (SF) a fáze mobilní (MF). SF je pevně zakotvena v chromatografické koloně, zatímco MF se ze zásobníků přes směšovač MF do kolony přivádí a protéká jí. Každá látka je na koloně zadržována různě dlouho a tím dochází k separaci jednotlivých složek analyzovaného vzorku.

Podle typu MF lze chromatografii rozdělit na kapalinovou, kde MF je kapalina, polární či nepolární, a plynovou, kde je jako MF používán inertní plyn.

Typy detektorů na konci chromatografických kolon je celá škála. Jedná se o nejčastěji využívané UV/VIS detektory, hmotnostní detektory, DAD detektory. Méně často se lze setkat s chromatografy spojené s fluorescenční detekcí, vodivostním nebo amperometrickým detektorem [38].

Nejpoužívanější metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), při které lze využít gradientové eluce, reverzních fází a modifikací, které zajistí ideální podmínky pro separaci daných analytů. Z odborné literatury byly vybrány tři práce zabývající se stanovením arbutinu, jež jsou detailněji komentovány níže.

I. Kvantifikace arbutinu v rostlinné biomase pomocí HPLC

Mezi doposud nevyužívané, ale přesto cenné zdroje fenolických látek, mezi které patří také arbutin, se řadí materiál z ovocných stromů. Pod tímto označením se skrývá listí, kůra, pupeny, květy a štěpka. Tyto hojně se vyskytující se materiály tak nabízejí možnost být recyklovány a dále využity v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu.

Vyvinutá HPLC metoda nebyla určena pouze k detekci a kvantifikaci arbutinu, zabývala se i jinými fenolickými látkami, mezi které patří kyselina chlorogenová, rutin a floridzin. Její součástí bylo také stanovení celkové antioxidační aktivity metodou průtokové injekční analýzy. Dalším sledovaným subjektem byl měnící se fenolický profil v rámci vegetačního období v materiálu z ovocných stromů.

Rostlinný materiál z hrušni byl před analýzou homogenizován pomocí mixéru (listy) nebo třecí misky (kůra, pupeny, květy a štěpka). Zhomogenizovaný materiál se následně podrobil extrakci do methanolu s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí. Extrakce probíhala v ultrazvukové lázni. Po extrakci následovala centrifugace a filtrace přes stříkačkový filtr do vialky. Takto připravený extrakt lze přímo dávkovat do chromatografického systému.

Analýza fenolických látek probíhala na HPLC systému Shimadzu LC-10 vybaveného kolonou ASCENTIS Express RP-Amide. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a ultračisté vody, která byla okyselena přídavkem kyseliny fosforečné na pH 2,2. Separace probíhala za použití lineární gradientové eluce při průtokové rychlosti 1 ml/min. Objem dávkovaný na kolonu byl 1 µl. Retenční čas arbutinu je 2,28 min. Detekce separovaných analytů probíhala pomocí DAD detektoru. Vlnová délka pro hodnocení arbutinu byla 220 nm. Koncentrace arbutinu byla stanovena pomocí integrované plochy pod píkem a porovnávána se standardem a potvrzena jeho absorpčním spektrem.

Obsah arbutinu a dalších fenolických látek byl přepočítáván na jednotky mg/g sušiny rostlinného materiálu. Lineární rozsah metody pro arbutin byl testován v rozmezí 100-1250 mg/l. Množství arbutinu se lišilo v závislosti na analyzované materiálu – kůra, listy, pupeny, květy, plody. Další roli v obsahu arbutinu hrálo vegetační období hrušni.

Nejvyšší koncentrace arbutinu byla zaznamenána v hrušni odrůdy Grosdemange, přesněji v její kůře v období října a listopadu 2019. Stanovená koncentrace byla 54,61 mg/g. Naopak nejmenší koncentrace arbutinu byla v plodech hrušně odrůdy Konference v srpnu a září 2019, a to 1,085 mg/g^[3].

II. Kvantifikace α -arbutinu a β -arbutinu v kosmetických přípravcích, lécích a doplňcích stravy pomocí HPLC

Metoda byla optimalizována pro sledování α -arbutinu a β -arbutinu zároveň v kosmetických přípravcích, lécích a potravinových doplňcích využívá HPLC s hydrofilními interakcemi a efektivně separuje oba izomery.

Při použití HPLC s reverzními fázemi s kolonami na bázi C18 byl sice arbutin separován od méně polárního hydrochinonu, ale retenční časy jeho α a β izomerů byly velmi blízké a píky se mnohokrát překrývaly. S použitím SF s požadovanými vlastnostmi umožňující hydrofilní interakce se dosáhlo lepší separace a tím rozdílných retenčních časů.

Před analýzou se prováděly následující úpravy vzorků: Precipitace nežádoucích biopolymerů (např. kyseliny hyaluronové v kosmetických přípravcích) pomocí acetonitrilu. Díky této úpravě se odstranily případné interference, které tyto látky způsobují. Po precipitaci následovala centrifugace a filtrace přes nylonový filtr pro odstranění supernatantu. Po těchto úpravách lze vzorek přímo dávkovat na kolonu. Analyty byly dávkovány na kolonu Cyclobond I 2000 při 25 °C, se SF tvořenou 5 μ m silikagelovými částicemi pokrytými β -cyklodextrinem. Jako MF byla zvolena směs acetonitrilu a destilované vody v poměru 92:8 a průtokem 0,8 ml/min. UV detekce probíhala při vlnové délce 284 nm pomocí DAD detektoru. Pro potvrzení identity obou analytů se dodatečně stanovovala hodnota měrné otáčivosti pomocí polarimetru.

Metoda vykazovala vysokou citlivost s mezí detekce 0,003 % (w/w) a mezí stanovitelnosti 0,009% (w/w), čímž je vhodná pro kvantifikaci arbutinu ve velice nízkých koncentracích. Hlavní předností je však fakt, že použití chromatografie s hydrofilními interakcemi bylo vhodné pro spolehlivé oddělení obou isomerů, α -arbutinu a β -arbutinu, a to v čase kratším než 10 minut. Další výhodou je kompatibilita precipitace při odstranění interferující matrice v preanalytické části pomocí acetonitrilu, který je jakožto organické rozpouštědlo dobře kompatibilní s tímto typem chromatografie. Preanalytická úprava byla snadná a odpadla práce s toxickými činidly při derivatizaci ^[33].

III. Kvantifikace arbutinu v doplňcích stravy pomocí GC

Technika GS/MS představuje další možnost stanovení arbutinu. Před samotnou analýzou je však potřeba arbutin podrobit derivatizaci, díky které se sníží jeho teplota varu a bude snáz převeden do plynného skupenství, které je potřebné pro dávkování na kolonu.

Metoda byla vyvinuta pro určování obsahu arbutinu společně s hydrochinonem v bylinných přípravcích na hubnutí, které jsou volně dostupné na trhu v Turecku a obsahují Vřes obecný (*Calluna vulgaris*), kterému jsou připisovány diuretické, antioxidační a antimikrobní vlastnosti. Ve většině případů se jedná o čajové směsi. Ačkoliv je účinek těchto produktů diskutabilní, je v zájmu veřejného zdraví správně určit množství obsahované látky v těchto preparátech.

Před samotnou separací bylo nutno provést extrakci, lze tak učinit pomocí destilované vody nebo methanolu. Následně se extrakty podrobí filtraci. Vodný extrakt byl lyofilizován a methanolvý extrakt vysušen do sucha. Pro zvýšení účinnosti chromatografické separace a snazšího převedení sloučenin do plynného skupenství byla provedena derivatizace hydrochinonu a arbutinu ve vzorcích pomocí MSTFA (methylsilyltrifluoracetamid). Ke vzorkům byla přidána směs acetonitrilu a MSTFA a takto byla provedena silylace hydroxylové skupiny.

Pro kontroly kvality a standardizaci byly připraveny roztoky arbutinu a hydrochinonu, které se rozpustily v acetonitrilu o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Tyto roztoky byly následně zředěny chloroformem na výsledné koncentrace standardních roztoků 5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 ng/ml. I u těchto roztoků se provádí derivatizace, stejně jako u analyzovaných vzorků.

Připravené vzorky byly dávkovány pomocí autosampleru ve splitless módu. Dávkovaný objem byl 1 ml. Jako nosný plyn bylo použito helium s rychlostí proudění 1 ml/min. Separace probíhá na koloně HP-5 MS dlouhé 30 m s průměrem 0,25 µm, při gradientu teplot od 100 °C po 300 °C. Sorbent kolony byl tvořen dimethylpolysiloxanem (95 %) a difenylem (5 %).

Detekce byla umožněna pomocí hmotnostního spektrometru Agilent v režimu skenování vybraného iontu (selected ion monitoring). Separované složky byly ionizovány pomocí elektronové ionizace s energií elektronů 70 eV. Detekce iontů probíhá na kvadrupólovém analyzátoru. Retenční čas pro hydrochinon byl 5,44 minut a pro arbutin 11,32 minut. Poměry hmotnosti a náboje byly pro arbutin 254 a pro hydrochinon 239.

Obsah obou látek v analyzovaných přípravcích byl vypočítán pomocí integrace plochy pod píkem a porovnáním se standardy. Analyzováno bylo celkem 9 bylinných produktů na hubnutí, ve kterých byly rozličné koncentrace arbutinu, pohybovaly se mezi 18.88 ng/ml a 63.43 ng/ml [37].

8.2.2. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

CZE je elektroforetická metoda, díky které se analyty od sebe navzájem separují na základě různých pohyblivostí v elektrickém poli v kapilárách naplněných elektrolytem. Pohyb analytů zajišťují dvě síly: elektroforetická migrace a elektroosmotický tok (EOF). EOF je výsledkem ionizace silanolové stěny kapiláry, která se chová, jako by nesla negativní náboj. Kladné ionty elektrolytu jsou negativní vnitřní stěnou kapiláry přitahovány a tvoří se tak elektrická dvojrstva. Po vložení napětí tyto kladné kationty putují ke katodě a strhávají s sebou také anionty. EOF je po dobu separace je v celém profilu kapiláry rovnoměrně rozdělený. Přístrojové uspořádání je jednoduché, skládá se z kapiláry, zásobníku elektrolytu, elektrod, zdroje napětí a detektoru [39].

Popisovaná metoda byla určena ke stanovení obsahu arbutinu v listech Medvědice lékařské, jejíž hlavní fenolickou složkou je právě arbutin, který je v této rostlině přítomen v rozsahu 6-15 %.

Listy Medvědice lékařské je nutno vysušit a pomlít. Takto zpracované listy byly následně 30 minut za varu extrahovány do destilované vody, extrakt se přefiltroval a filtrát se podrobil centrifugaci. Supernatant se poté naředil na požadovaný objem. V této fázi přípravy byl ke vzorku přidán vnitřní standard, resorcinol, který se v listech analyzované rostliny přirozeně nevyskytuje. Takto připravený vzorek byl aplikován k anodickému konci kapiláry. Zónová elektroforéza probíhala v prostředí borátového pufru při pH 9,5. Separace byla uskutečněna v křemenné kapiláře při síle elektrického pole 350 V/cm a elektrickém proudu 70 μ A.

Detekce analytu probíhal pomocí UV spektrometru, při vlnové délce 214 nm. Absorbance se následně přepočítala na množství analytu ve vzorku. Pomocí CZE došlo k separaci jednotlivých komponent z listů Medvědice lékařské, jako první byl detekován arbutin, následně vnitřní standard, resorcinol, dále hydrochinon, a nakonec kyselina gallová. Všechny tyto složky byly ve vzorcích navzájem dobře rozlišené [40].

8.3. Spektrofotometrie

Mezi méně používané metody stanovení arbutinu patří spektrofotometrické metody, které jsou založené na principu měření absorbance daného vzorku. Pomocí kalibračních křivek je pak možno kvantifikovat stanovovanou látku. Jedná se o metody, které jsou levnější než metody separační, mezi něž se řadí nejpoužívanější HPLC, avšak nemohou nabídnout odseparování jednotlivých komponent analyzovaného materiálu. Dále je potřeba ke zvýšení selektivity stanovení arbutin vhodně derivatizovat na produkt, který absorbuje viditelné záření. Nevýhodou jsou interferující barevné látky, které následně zkreslují hodnoty absorbance. V následujících dvou podkapitolách jsou představeny dvě metody, které byly vyvinuty s cílem zajistit levný, přesný a jednoduchý způsob kvantifikace arbutinu ^[41].

I. Přímé spektrofotometrické stanovení – komplexotvorná reakce arbutinu a FeCl_3

Arbutin v přítomnosti chloridu železitého tvoří komplex žlutozelené barvy. Tato reakce probíhá prakticky ihned za laboratorní teploty. Vzniklý barevný roztok se následně převede do kyvety a měří se jeho absorbance při vlnové délce 292 nm. Koncentrace arbutinu v roztoku se určí pomocí výpočtu z rovnice kalibrační křivky ^[41]. Bohužel tato práce popisuje pouze optimalizaci derivatizační reakce bez aplikace na reálné vzorky.

II. Nepřímé spektrofotometrické stanovení – oxidace arbutinu jodistanem draselným

Nepřímého stanovení obsahu arbutinu může být dosaženo jeho oxidací pomocí jodistanu draselného, který je v případě nepřímého stanovení v nadbytku. Zbylý jodistan v přítomnosti jodidu draselného v mírně zásaditém prostředí při pH 8, které zajišťuje borátový pufr reaguje za uvolnění ekvivalentního množství jódu. Množství vzniklého jódu odpovídá množství nezreagovaného jodistanu draselného. K analyzovanému vzorku s obsahem arbutinu v destilované vodě se přidá jodistan draselný v nadbytku a směs se nechá 20-25 minut inkubovat při pokojové teplotě. Mírné kolísání teploty mezi 15 a 25 °C nemá téměř žádný efekt na oxidační reakci. Hydroxylové skupiny arbutinu jsou oxidovány na keto a aldehydové skupiny. K nezreagovanému jodistanu se přidá jodid draselný a dochází k uvolnění jódu. Množství uvolněného jódu je následně měřeno spektrofotometricky při vlnové délce 351 nm. Mez stanovitelnosti této metody je 25 μg arbutinu /ml. Tímto způsobem lze stanovit škálu látek, mezi něž patří hydraziny, fenoly, thioly, catecholaminy a deriváty těchto sloučenin ^[41].

Obě výše popsané metody byly vyvinuty za použití čistých roztoků arbutinu. Lze tedy předpokládat, že pro jejich využití k analýze reálných vzorků by bylo zapotřebí před vlastní analýzou zařadit žádoucí kroky, vedoucí k potlačení matricových efektů, specifických pro daný analyzovaný materiál (kosmetický produkt, doplněk stravy, či rostlinný materiál).

8.4. Elektrochemické metody

Mezi velice citlivé metody kvantifikace analytů patří elektrochemické metody. Stejně jako u spektrofotometrických metod se jedná o levnější a snáze proveditelný způsob stanovení. Níže představený je způsob kvantifikace arbutinu jímž je metoda diferenční pulzní voltametrie.

Diferenční pulzní voltametrie (DPV)

Poslední představenou metodou je stanovení arbutinu v kosmetickém přípravku za použití diferenční pulzní voltametrie. V průběhu měření je na elektrody vkládán vzrůstající potenciál s pulsy. Pozorovanou veličinou je elektrický proud (I), který je snímán před (I_1) a po vložení pulsu (I_2). Následně se hodnota před pulsem odečte do hodnoty po pulsu a zanesse se do grafu, výsledkem měření je pík, jehož vrchol odpovídá koncentraci analytu a hodnota napětí, při které bylo dosaženo maxima, odpovídá půlvlnovému potenciálu, který je kvalitativním ukazatelem. Při DPV se eliminuje zdroj šumu, kterým je kapacitní proud a tím dochází ke snížení limitu detekce.

Při voltametii je generovaný proud přímo úměrný koncentraci analytu, je výsledkem redoxních dějů probíhajících na elektrodě. Diferenční pulzní voltametrie pak umožňuje stanovit látky ve velice nízkých koncentracích a s vysokou citlivostí ^[42].

DPV využívá tři elektrod: Pracovní elektroda – Uhlíková pastová elektroda (CPE), referenční elektroda – Argentochloridová s 3 M KCl a pomocná elektroda – Platinová. CPE elektrody se skládají z elektrodového pouzdra, do kterého je plněna uhlíková pasta, jejíž hlavními složkami jsou uhlíkový prášek a kapalné pojivo. CPE je často využívána pro svou vysokou citlivost, nízký reziduální proud, finanční nenáročnost, obnovitelnost a reprodukovatelné výsledky ^[43].

Elektrody mohou být modifikovány použitím nanočástic na jejich povrchu, čímž lze vylepšit jejich vlastnosti, mezi které patří mechanická pevnost, větší povrch, chemická

stabilita, nižší limity detekce nebo elektrická vodivost. Jako modifikátory lze použít kovy či oxidy kovů (například oxidy železa, titanu, mědi) ^[42].

Měření probíhalo v kyselém prostředí Brittonova-Robinsonova (BR) pufru na hodnotě pH 2 ^[43]. Kyselé pH zajišťuje protonizaci hydroxylové skupiny na molekule arbutinu a tím zlepšuje jeho interakci s povrchem elektrody a vykazuje nejlépe kvantifikovatelný pík ^[42].

Zásobní roztok arbutinu pro kalibrační roztoky byl připraven rozpuštěním přesné navážky arbutinu v destilované vodě. Při proměřování kalibrační křivky byly použity kalibrační roztoky v rozsahu 1×10^{-4} až 4×10^{-6} mol/l v BR pufru o hodnotě pH 2.

Přístroj použitý k měření byl Eco Tribo polarograf, Software Polar Pro v. 5.1 (Polaro-Sensors, spol.s.r.o., Praha). Reálným vzorkem v této analýze byl kosmetický krém Unitone 4 α -arbutin. Sledovaná látka, v něm zaujímá 2 %. Reálný vzorek se extrahoval do methanolu a do destilované vody. Ve vodě nedošlo k úplnému rozpuštění matrice vzorku, v methanolu ano.

Pomocí akumulčního kroku po čase 10 minut nedošlo ke zvýšení citlivosti. Mez detekce byla stanovena jako $0,73 \times 10^{-6}$ mol/l a meze stanovitelnosti $2,42 \times 10^{-6}$ mol/l.

Na reálných vzorcích kosmetického krému, které byly extrahovány do methanolu, metoda poskytuje vysokou opakovatelnost a velmi dobrou shodu naměřené hodnoty s uvedeným obsahem stanovované látky v krému. Vzorky rozpuštěny v destilované vodě nedosahují tak dobrých výsledků, jako ty extrahované do methanolu. Neúplné rozpuštění krémové matrice kosmetického přípravku zamezilo účinné extrakci arbutinu a tím došlo ke zkreslení naměřených hodnot ^[43].

Sumarizace metod stanovení arbutinu

Tabulka 1: Souhrn popisovaných metod

Princip metody	Metoda	Analyzovaný materiál	Detekce	Ref.
SEPARAČNÍ	HPLC	Rostlinná biomasa	DAD detektor	[3]
	HPLC s hydrofilními interakcemi	Potravinové doplňky, léky, kosmetické přípravky	DAD detektor	[33]
	GC	Potravinové doplňky	Hmotnostní spektrometr	[37]
	CZE	Rostlinný materiál	UV spektrometr	[40]
SPEKTRÁLNÍ	Komplexotvorná reakce s FeCl_3		Detekce barevného produktu pomocí spektrofotometru	[41]
	Reakce s KIO_4		Detekce barevného produktu pomocí spektrofotometru	[41]
ELEKTROCHEMICKÉ	DPV	Kosmetické přípravky	Polarograf	[43]

9. Závěr

Tato bakalářská práce sumarizuje především informace o arbutinu a jeho biologických vlastnostech. Jakožto fenolická bioaktivní látka má arbutin široké spektrum využití napříč obory medicíny. Jeho nejčastější využití se však nachází v léčbě hyperpigmentace a infekcí močového traktu. Další předností jsou jeho antioxidační účinky a také jeho možnosti aplikace v protinádorové léčbě, která je prozatím stále ve stádiu výzkumu.

Dále práce stručně sumarizuje možnosti stanovení arbutinu různými analytickými technikami. Mezi nejvyžívanější metody stanovení, jak v rostlinném materiálu, ze kterého lze arbutin získat, tak v produktech, ve kterých se arbutin jakožto účinná látka nachází, se řadí separační metody, přesněji vysokoúčinná kapalinová chromatografie s DAD detekcí, metodou, která je rychlá a separačně účinná a vedle arbutinu lze analyzovat i další komponenty daného analytického vzorku. Dále lze arbutin stanovit plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí, kapilární zónovou elektroforézou, diferenční pulzní voltametrií nebo spektrofotometricky.

10. Seznam obrázků

Obr. 1: Chemická struktura α – arbutinu	9
Obr. 2: Chemická struktura β – arbutinu	9
Obr. 3: Reakce acetylhalogenidu a β -D-glukosy, vzniká 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -glykopyranosyl	14
Obr. 4: Reakce 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -glykopyranosyl halogenidu s hydrochinonem za vzniku arbutinu	15
Obr. 5: Reakce 2,3,4,5,6-penta-O-acetyl- β -D-glukospyranosy a 4-hydroxyfenylacetátu za vzniku 2,3,4,5,6-penta-O-acetyl- β -arbutinu	16
Obr. 6: Reakce 2,3,4,5,6-penta-O-acetyl- β -arbutinu ve vodném roztoku methanolu s přídavkem K_2CO_3 za vzniku β -arbutinu	16
Obr. 7: Reakce vzniku DOPA hydroxylací tyrosinu působením tyrozinázy	19
Obr. 8: Reakce vzniku dopachinonu oxidací DOPA působením tyrozinázy	20

11. Seznam tabulek

Tabulka 1: Souhrn popisovaných metod	35
--	----

12. Seznam použité literatury

1. CEPANEC, Ivica a Mladen LITVIC. Simple and efficient synthesis of arbutin. *Arkivoc.* 2008, 2008(2), 19-24. ISSN 1551-7012. Dostupné z: doi:10.3998/ark.5550190.0009.203
2. ZHOU, Hangyu, Jing ZHAO, Aitao LI a Manfred T. REETZ. Chemical and Biocatalytic Routes to Arbutin †. *Molecules.* 2019, 24(18), 2. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24183303
3. ADAMCOVÁ, Anežka, Dalibor ŠATÍNSKÝ, Slavomíra ZATROCHOVÁ, Marcela ŠÍROVÁ a Kristýna ŠILHAVÁ. Metodika pro identifikaci a detekci bioaktivních látek v rostlinných částech stromů a odpadní biomase. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2021. ISBN 978-80-906644-7-0.
4. BOO, Yong Chool. Arbutin as a Skin Depigmenting Agent with Antimelanogenic and Antioxidant Properties. *Antioxidants.* 2021, 10(7), 1-22. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox10071129
5. FENG, Yifan, Xiang LI, Qiaoran YANG, Deliang GUO, Yangguang LI, Yanbin TONG a Bang-Ce YE. Dual-template molecularly imprinted electrochemical sensor based on foamed iron-based MOF for simultaneous and specific detection of α -arbutin and β -arbutin in cosmetics. *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 2023, 928. ISSN 15726657. Dostupné z: doi:10.1016/j.jelechem.2022.117031
6. SAEEDI, Majid, Khadijeh KHEZRI, Abbas SEYED ZAKARYAEI a Hassan MOHAMMADAMINI. A comprehensive review of the therapeutic potential of α -arbutin. *Phytotherapy Research.* 2021, 35(8), 4136-4154. ISSN 0951-418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.7076
7. Integrated Laboratory Systems, Inc. Chemical Information Review Document for Arbutin [CAS No. 497-76-7] and Extracts from *Arctostaphylos uva-ursi*. Research Triangle Park, NC, 01/2006n. I.
8. MIGAS, Piotr a Mirosława KRAUZE-BARANOWSKA. The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochemistry Letters.* 2015, 13(962), 35-40. ISSN 18743900. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytol.2015.05.015
9. YANG, Chao-Hsun, Nai-Fang CHANG, Yi-Shyan CHEN, Shu-Mei LEE, Pei-Jin LIN a Chih-Chien LIN. Comparative Study on the Photostability of Arbutin and Deoxy Arbutin: Sensitivity to Ultraviolet Radiation and Enhanced Photostability by the Water-Soluble Sunscreen, Benzophenone-4. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2014, 77(5), 1127-1130. ISSN 0916-8451. Dostupné z: doi:10.1271/bbb.130042

10. ENGUIITA, Francisco J. a Ana Lúcia LEITÃO. Hydroquinone: Environmental Pollution, Toxicity, and Microbial Answers. *BioMed Research International*. 2013, 2013(542168), 1-14. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2013/542168
11. NAHAR, Lutfun, Afaf AL-GROSHI, Anil KUMAR a Satyajit D. SARKER. Arbutin: Occurrence in Plants, and Its Potential as an Anticancer Agent. *Molecules*. 2022, 27(24), 2-22. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27248786
12. BULDUK, İbrahim, Mehtap Dönmez ŞAHİN a Senem ŞANLI. Arbutin Analysis in Leaves, Fruit and Branches of *Pyrus Anatolica*, Method Optimization. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 2016, 11(5), 233-244. Dostupné z: doi:10.12973/ejac.2016.135a
13. XU, Ke-Xin, Meng-Ge XUE, Zhimin LI, Bang-Ce YE a Bin ZHANG. Recent Progress on Feasible Strategies for Arbutin Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022, 10. ISSN 2296-4185. Dostupné z: doi:10.3389/fbioe.2022.914280
14. Ultrazvuková extrakce z rostlin. *Pragolab* [online]. 2020 [cit. 2023-04-18]. Dostupné z: <https://www.pragolab.cz/ultrazvukova-extrakce-z-rostlin>
15. ŽIVKOVIĆ, Jelena, Jelena VLADIĆ, Abdulhakim NAFFATI, Nataša NASTIĆ, Katarina ŠAVIKIN, Milan TOMIĆ a Senka VIDOVIĆ. Comparative Chemical Profiling of Underexploited *Arctostaphylos uva-ursi* L. Herbal Dust Extracts Obtained by Conventional, Ultrasound-Assisted and Subcritical Water Extractions. *Waste and Biomass Valorization*. 2022, 13(10), 4147-4155. ISSN 1877-2641. Dostupné z: doi:10.1007/s12649-022-01770-5
16. ALBERO, Beatriz, José L. TADEO a Rosa A. PÉREZ. Ultrasound-assisted extraction of organic contaminants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019, 118, 739-750. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.07.007
17. HUANG, Shen-lin, Yu-lin ZHU, Yuan-jiang PAN a Shi-hua WU. Synthesis of arbutin by two-step reaction from glucose. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE A*. 2004, 5(12), 1509-1511. ISSN 1673-565X. Dostupné z: doi:10.1631/jzus.2004.1509
18. AN, Ning, Chong XIE, Shubin ZHOU, Jia WANG, Xinxiao SUN, Yajun YAN, Xiaolin SHEN a Qipeng YUAN. Establishing a growth-coupled mechanism for high-yield production of β -arbutin from glycerol in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*. 2023, 369(128491). ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2022.128491
19. KWIECIEŃ, Inga, Agnieszka SZOPA, Kornelia MADEJ a Halina EKIERT. Arbutin production via biotransformation of hydroquinone in *in vitro* cultures of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott. *Acta Biochimica Polonica*. 2013, 60(4), 865-870. ISSN 1734-154X. Dostupné z: doi:10.18388/abp.2013_2074

20. YU, Shuhuai, Yongchun WANG, Yuqing TIAN, Wei XU, Yuxiang BAI, Tao ZHANG a Wanmeng MU. Highly efficient biosynthesis of α -arbutin from hydroquinone by an amylosucrase from *Cellulomonas carboniz*. *Process Biochemistry*. 2018, 68, 93-99. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2018.02.012,,
21. PARVEZ, Shoukat, Moonkyu KANG, Hwan-Suck CHUNG, Chongwoon CHO, Moo-Chang HONG, Min-Kyu SHIN a Hyunsu BAE. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytotherapy Research*. 2006, 20(11), 921-934. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.1954
22. SUGIMOTO, Kazuhisa, Takahisa NISHIMURA, Koji NOMURA, Kenji SUGIMOTO a Takashi KURIKI. Syntheses of Arbutin-.ALPHA.-glycosides and a Comparison of Their Inhibitory Effects with Those of .ALPHA.-Arbutin and Arbutin on Human Tyrosinase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2003, 51(7), 798-801. ISSN 0009-2363. Dostupné z: doi:10.1248/cpb.51.798
23. MARANDUCA, Minela, Daciana BRANISTEANU, Dragomir SERBAN, Daniel BRANISTEANU, Gabriela STOLERIU, Nicuta MANOLACHE a Ionela SERBAN. Synthesis and physiological implications of melanic pigments (Review). *Oncology Letters*. 2019, 17. ISSN 1792-1074. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2019.10071
24. SHIM, Joong-Hyun. Inhibitory Effects of Cycloheterophyllin on Melanin Synthesis. *Molecules*. 2021, 26(9). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26092526
25. GOLDFEDER, Mor, Margarita KANTEEV, Sivan ISASCHAR-OVDAT, Noam ADIR a Ayelet FISHMAN. Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins. *Nature Communications*. 2014, 5(1). ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms5505
26. NAWARAK, Jiraporn, Rosa HUANG-LIU, Shao-Hsuan KAO, Hsien-Hua LIAO, Supachok SINCHAIKUL, Shui-Tein CHEN a Sun-Long CHENG. Proteomics analysis of A375 human malignant melanoma cells in response to arbutin treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2009, 1794(2), 159-167. ISSN 15709639. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2008.09.023
27. MURRAY, Michael T. *Uva ursi (Bearberry)*. *Textbook of Natural Medicine*. Elsevier, 2013, 2013, 1068-1070. ISBN 9781437723335. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4377-2333-5.00130-9

28. ASADI, Kamar, Mohammad REZA, Mehri HABIBI a Saeid BOUZARI. Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic Escherichia coli. *Molecular Immunology*. 2019, 108, 56-67. ISSN 01615890. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2019.02.007
29. FLORES-MIRELES, Ana L., Jennifer N. WALKER, Michael CAPARON a Scott J. HULTGREN. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*. 2015, 13(5), 269-284. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro3432
30. QUINTUS, Joachim, Karl-Artur KOVAR, Peter LINK a Harald HAMACHER. Urinary Excretion of Arbutin Metabolites after Oral Administration of Bearberry Leaf Extracts. *Planta Medica*. 2005, 71(2), 147-152. ISSN 0032-0943. Dostupné z: doi:10.1055/s-2005-837782
31. SCHINDLER, Gemot, Ulrich PATZAK, Benno BRINKHAUS, Alexander VON NIECIECKI, Jörg WITTIG, Nils KRÄHMER, Ingmar GLÖCKL a Markus VEIT. Urinary Excretion and Metabolism of Arbutin after Oral Administration of Arctostaphylos uvae ursi Extract as Film-Coated Tablets and Aqueous Solution in Healthy Humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2002, 42(8), 920-927. ISSN 00912700. Dostupné z: doi:10.1177/009127002401102740
32. MA, Changyang, Nan HE, Yingying ZHAO, Dandan XIA, Jinfeng WEI a Wenyi KANG. Antimicrobial Mechanism of Hydroquinone. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2019, 189(4), 1291-1303. ISSN 0273-2289. Dostupné z: doi:10.1007/s12010-019-03067-1
33. REPERT, Sarah, Sandra MATTHES a Wilfried ROZHON. Quantification of Arbutin in Cosmetics, Drugs and Food Supplements by Hydrophilic-Interaction Chromatography. *Molecules*. 2022, 27(17), 1-12. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27175673
34. JURICA, Karlo, Ivana GOBIN, Dario KREMER, Dubravka Vitali ČEPO, Renata Jurišić GRUBEŠIĆ, Irena Brčić KARAČONJI a Ivan KOSALEC. Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves. *Journal of Herbal Medicine*. 2017, 8, 17-23. ISSN 22108033. Dostupné z: doi:10.1016/j.hermed.2017.03.006
35. MUNTEANU, Irina GEORGIANA a Constantin APETREI. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(7). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22073380

36. YANG, Bowen, CHEN a Jianlin SHI. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chemical Reviews*. 2019, 119(8). ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.8b00626
37. DURSUNOĞLU, Benan, Hafize YUCA, Zühal GÜVENALP, Sefa GÖZCÜ a Bilal YILMAZ. Simultaneous determination of arbutin and hydroquinone in different herbal slimming products by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *The Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018, 27(17), 298-302. ISSN 1304530X. Dostupné z: doi:10.4274/tjps.38258
38. NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a Petr ČESLA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 2. přepracované a rozšířené vydání*. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
39. SUNTORNSUK, Leena. Capillary electrophoresis of phytochemical substances. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002, 27(5), 679-698. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/S0731-7085(01)00531-3
40. KENNDLER, E., Ch. SCHWER, B. FRITSCHÉ a M. PÖHM. Determination of arbutin in *uva-ursi folium* (bearberry leaves) by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1990, 514(1), 383-388. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)89414-0
41. BARSOOM, B.N., A.M.E. ABDELSAMAD a N.M. ADIB. Indirect spectrophotometric determination of arbutin, whitening agent through oxidation by periodate and complexation with ferric chloride. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2006, 64(4), 844-852. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2005.08.013
42. ÖZCAN, Levent, Büşra ÜNLÜSOY a Sedat YURDAKAL. Voltammetric determination of arbutin using carbon paste electrode modified with low crystalline home-prepared rutile TiO₂ nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*. 2023, 301, 2-11. ISSN 02540584. Dostupné z: doi:10.1016/j.matchemphys.2023.127588
43. LIBÁNSKÝ, Milan. *Stanovení arbutinu na uhlíkové pastové elektrodě*. Praha, 2011. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Zima, Jiří.