

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMAKOGNOZIE**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Antiradikálová aktivita přírodních látek. II.**

Vypracovala: Petra Stehnová

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Oponent:

Datum zadání: 29. 10. 2004

Termín odevzdání: 15. 5. 2006

Datum obhajoby: 6. 6. 2006

Děkuji Doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. za odborné vedení a pomoc při zpracování diplomové práce, a za vstřícný přístup při konzultacích.

Tuto diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pod odborným vedením školitele a za použití uvedené literatury.

V Hradci Králové, 15. 5. 2006

.....

# OBSAH

SEZNAM UŽITÝCH ZKRATEK.....	7
1 ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1 Volné radikály.....	10
2.2 Třezalka tečkovaná .....	12
2.2.1 Botanický popis .....	12
2.2.2 Obsahové látky .....	13
2.2.3 Farmakologické účinky.....	13
2.2.4 Přípravky s obsahem třezalky tečkované.....	15
2.3 Stanovení antioxidační aktivity .....	16
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	18
3.1 Použitý materiál, přístroje a pomůcky .....	18
3.1.1 Rostlinný materiál.....	18
3.1.2 Chemikálie .....	18
3.1.3 Přístroje a pomůcky .....	19
3.2 Stanovení flavonoidů .....	19
3.3 Stanovení hypericinů .....	20
3.4 Stanovení ztráty sušením .....	21
3.5 Stanovení zbytku po vysušení extraktů .....	21
3.6 Stanovení antioxidační aktivity .....	22
3.6.1 Příprava roztoku DPPH .....	22
3.6.2 Příprava extraktů z drog.....	22
3.6.2.1 Metanolvý extrakt.....	23
3.6.2.2 Vodný extrakt .....	23
3.6.3 Stanovení antioxidační aktivity extraktů z drog .....	23
3.6.3.1 Stanovení antioxidační aktivity metanolvých extraktů.....	23
3.6.3.1.1 Stanovení antioxidační aktivity <i>Hyperici herba</i> z oblasti Snina....	23
3.6.3.1.2 Stanovení antioxidační aktivity <i>Hyperici herba</i> z oblasti Stropkov .....	24
3.6.3.1.3 Stanovení antioxidační aktivity rutinu .....	24

3.6.3.2 Stanovení antioxidační aktivity vodných extraktů.....	25
3.6.3.2.1 Stanovení antioxidační aktivity <i>Hyperici herba</i> z oblasti Snina a Stropkov.....	25
3.6.3.2.2 Stanovení antioxidační aktivity rutinu.....	25
3.7 Tenkovrstvá chromatografie.....	26
3.7.1 Důkaz hyperosidu, rutinu a kys. chlorogenové v metanolovém extraktu.....	26
3.7.2 Důkaz hyperosidu, rutinu a kys. chlorogenové ve vodném extraktu.....	27
4 VÝSLEDKY.....	28
4.1 Antioxidační aktivita.....	28
4.2 Tenkovrstvá chromatografie.....	43
5 DISKUSE.....	48
6 ZÁVĚR.....	53
7 LITERATURA.....	54

## SEZNAM UŽITÝCH ZKRATEK

AA	antioxidační aktivita
ACE	angiotensin konvertující enzym
BHA	butylhydroxyanisol
BHT	butylhydroxytoluen
ČL	Český lékopis
DPPH	1,1 – difenyl – 2 – pikrylhydrazyllový radikál
MAO	monoaminoxidáza
SSRI	inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
TBHQ	butylhydrochinon

# 1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

V nedávných letech byl zaznamenán zvýšený zájem o antioxidanty, tedy o látky chránící organismus proti škodlivému působení volných radikálů. Běžně v organismu vznikají reaktivní formy kyslíku a dusíku mající fyziologický význam. Působí jako signální molekuly nebo zabíjejí fagocytované mikroorganismy. Množství volných radikálů však nesmí překročit míru schopností obranných mechanismů organismu. Mohlo by dojít k poškození organismu. Volné radikály se velkou měrou podílejí na rozvoji nemocí a komplikací s nimi související. Nadměrné množství reaktivních forem kyslíku a dusíku tak může mít za následek rozvoj chronických nemocí jako jsou rakovina, ateroskleróza a revmatismus. Oxidativní stres může hrát důležitou roli také v rozvoji neurodegenerativních onemocněních k nimž řadíme Alzheimerovu a Parkinsonovu chorobu. Na základě tohoto zjištění je snaha volné radikály eliminovat a omezit tak jejich škodlivé působení.

Za fyziologického stavu udržuje organismus potřebnou koncentraci volných radikálů enzymovými a neenzymovými mechanismy. Z enzymů jsou to superoxidodismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza a glutathionreduktáza. Kyselina močová, feritin, glutathion, ceruloplazmin, bilirubin, cystein a karnosin řadíme mezi neenzymové antioxidanty. Snaha zabránit škodlivému působení volných radikálů na organismus vede společnost k přijímání exogenních antioxidantů. Z exogenních neenzymatických antioxidantů jsou nejčastěji užívány tokoferoly, karotenoidy a kyselina askorbová. Některá potravní aditiva jako je butylhydroxyanisol (BHA), butylhydroxytoluen (BHT), propylgalát nebo butylhydrochinon (TBHQ) řadíme mezi syntetické antioxidanty. Také celá řada léků má antioxidační účinek, který mohou uplatnit při jejich působení na organismus. K antioxidačním látkám užívaných jako léky patří statiny, lokální anestetika, blokátory kalciového kanálu, ACE inhibitory, N-acetyl cystein a celá řada dalších (1).

V současné době je pozornost obrácena spíše na antioxidanty rostlinného původu vyskytující se v ovoci a zelenině, v čaji a léčivých rostlinách. K významným složkám výživy s antioxidačním účinkem patří polyfenoly obsažené v rostlinné stravě. Jedná se o různorodou skupinu látek obsahujících aromatické jádro s několika fenolovými skupinami. Hlavní část polyfenolických látek tvoří flavonoidy (1). Vysoký obsah

flavonoidů je v červeném víně, zeleném a černém čaji a celé řadě léčivých rostlin. Jsou buď nositeli účinku nebo se na hlavním účinku významně podílejí.

Jednou z nejčastěji užívaných léčivých rostlin je také třezalka tečkovaná a od ní odvozené produkty. Dramaticky tak stoupla spotřeba rostliny jako výchozí suroviny pro výrobu fytofarmak (2). Užívá se hlavně při léčbě mírných depresí. Poslední dobou je však stále více zkoumána kvůli antioxidačním schopnostem. Vedle hypericinu a hyperforinu najdeme v třezalce řadu aktivních sloučenin zahrnující fenolické sloučeniny, které mají schopnost působit jako zametači reaktivních forem kyslíku. Není přesně známo, zda jsou za antioxidační aktivitu zodpovědné polyfenolické látky, flavonoidy nebo hypericin, který patří do skupiny naftodiantronů a má 6 hydroxylových skupin, což je více, než mají některé rostlinné polyfenoly (3).

Cílem této práce bylo zjistit a porovnat antioxidační aktivitu vodných a metanolových extraktů *Herba hyperici*. K dispozici jsem měla usušenou nať *Hypericum perforatum* získanou sběrem v Prešovském kraji v lokalitách Snina a Stropkov (Slovensko). Byla měřena i antioxidační aktivita jedné z obsahových látek třezalky tečkované, rutinu. Antioxidační aktivita byla stanovena spektrofotometricky, metodou založenou na zhášení radikálu 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH).

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 VOLNÉ RADIKÁLY

V metabolismu aerobních buněk se za normálních podmínek objevují redoxní procesy, kterými vznikají volné radikály (2). Běžně se tak tvoří reaktivní formy kyslíku a reaktivní formy dusíku, které mají značný fyziologický i patogenetický význam. Jsou důležitými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však mohou působit jako toxické látky schopné organismus poškodit a někdy ho dokonce i usmrtit (4).

Volné radikály jsou schopné samostatné existence. Ve svém elektronovém obalu mají nepárový elektron, eventuelně více nepárových elektronů, které získaly ztrátou či přijetím. Jen některé z reaktivních forem kyslíku a dusíku jsou volnými radikály, tedy látky s nepárovým elektronem. V molekule některé orbitály tvoří chemické vazby mezi jednotlivými atomy. Volné radikály z nich pak vznikají hemolytickým štěpením kovalentní chemické vazby, nebo přidáním jednoho elektronu k normální molekule redukcí, nebo oxidací tedy ztrátou jednoho elektronu. K volným radikálům reaktivních forem kyslíku patří superoxid  $O_2\cdot^-$ , který je nejběžnějším radikálem, peroxy  $ROO\cdot$ , alkoxy  $RO\cdot$ , hydroperoxy  $HO_2\cdot$  a nejnebezpečnější je hydroxylový radikál  $OH\cdot$ . Peroxid vodíku  $H_2O_2$ , kyselinu chlornou  $HOCl$ , ozon  $O_3$  a singletový kyslík  $^1O_2$  řadíme k látkám, které nejsou volnými radikály, ale patří mezi reaktivní formy kyslíku. Oxid dusnatý  $NO\cdot$  a oxid dusičitý  $NO_2\cdot$  patří k volným radikálům reaktivních forem dusíku. Mezi látky, které nejsou volnými radikály spadá kyselina dusitá  $HNO_2$ , oxid dusitý  $N_2O_3$ , oxid dusičitý  $N_2O_4$ , nitroxid  $NO$ , nitrosyl  $NO^+$ , nitronium  $NO_2^+$ , peroxyinitrit  $ONOO$  a alkylperoxyinitrit  $ROONO$  (4). Jako radikály se chovají i atomy přechodných kovů (Fe, Cu, Ni, Mn, Ti) (1).

Většina volných radikálů je málo stabilních a vysoce reaktivních se snahou chybějící elektron doplnit. Chybějící elektron může získat setkáním s jiným radikálem. Častěji však dochází k vytržení elektronu ze „zdravé“ molekuly (1). Takto může dojít k poškození buňky, kdy jsou zničeny důležité molekuly, jako jsou proteiny, nukleové kyseliny nebo fosfolipidy buněčných membrán (2). Pokud nejsou radikály odstraňovány, napadají a přeměňují další sloučeniny v radikály a nastartují tak



řetězovou reakci. Tato reakce je ukončena až po setkání dvou radikálů nebo po setkání s látkou, jejíž radikál je stabilní a může delší dobu přetrvávat (1).

K poškození buňky ale nemusí vždy dojít. Za normálních okolností existuje rovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty (1). Buňka aktivuje obranné mechanismy, které zahrnují antioxidační enzymy a neenzymatické sloučeniny, které brání škodlivému působení volných radikálů (2). K antioxidačním enzymům patří superoxiddismutáza, kataláza, glutathionperoxidáza a glutathionreduktáza. Neenzymatické sloučeniny zahrnují proteiny, které změny oxidoredukční vlastnosti přechodných prvků, které tak přestanou katalyzovat radikálové reakce, dále sem řadíme askorbát redukující anorganické i organické radikály, či  $\alpha$ -tokoferol, který se mění na stabilnější radikál. Obranné mechanismy organismu proti oxidačnímu poškození vzájemně spolupracují, doplňují se a mnohdy i potencují. Funkce jednoho antioxidantu často podmiňuje účinek jiného (4).

Endogenní systém je často dostačující pro odklizení reaktivních forem kyslíku a dusíku (2). Dojde-li však k porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním volných radikálů označujeme to jako oxidační stres. Může být vyvolán nadměrnou produkcí reaktivních forem kyslíku a dusíku, nedostatečnou funkcí antioxidačního ochranného systému nebo kombinací obou těchto nedostatků. K nadměrné tvorbě reaktivních forem kyslíku dochází při některých metabolických situacích, při reoxygenaci tkáně po ischemii nebo po příjmu oxidoredukčně aktivních xenobiotik (4).

Volné radikály mohou přímo vyvolat vznik onemocnění, nebo mohou zhoršovat či komplikovat jeho průběh. Choroby, kde hrají volné radikály rozhodující úlohu, jsou nazývány nemocemi z volných radikálů („free radical diseases“) (1). K daným chorobám se řadí například ateroskleróza na jejímž počátku je oxidace lipoproteinů o nízké hustotě volnými radikály. Volné radikály mohou poškozovat  $\beta$ -buňky Langerhansových ostrůvků a podílet se na vzniku diabetu mellitus i na rozvoji jeho pozdních komplikací. Maligní přeměny buňky mohou být vyvolány působením volných radikálů na DNA. Reaktivní formy kyslíku a dusíku se podílejí také na onemocnění trávicího traktu. Zvýšená produkce volných radikálů byla prokázána u infekce *Helicobacter pylori*. U Crohnovy choroby byla popsána nedostatečná antioxidační ochrana. Centrální nervový systém obsahuje velké množství lipidové tkáně, která může být volnými radikály poškozena. U Parkinsonovy choroby byl prokázán zvýšený výskyt volných radikálů a určitou roli hrají také v rozvoji Alzheimerovy choroby (1). Reaktivní formy kyslíku, jako je superoxid, jsou přítomny také v zánětlivé tkáni. Jejich

producenty jsou aktivované leukocyty, neutrofilny a makrofágy, které uvolňují i proteolytické enzymy. Tím přispívají k destrukci mikroorganismů, ale také poškozují tkáň postiženou zánětem. Z reaktivních forem dusíku se zánětlivého procesu účastní oxid dusnatý (NO·) produkovaný v makrofázích a přispívá k zabíjení intracelulárně přežívajících patogenů. Vasodilatační účinky oxidu dusnatého přispívají ke zvýšenému prokrvení zánětlivé tkáně. Reaktivní formy kyslíku mohou atakovat nukleové kyseliny a modifikovat je na nepřirozené deriváty, které zavedou chybu při replikaci DNA (mutace) a takové modifikace mohou mít vliv i na karcinogenezi (4).

Volné radikály mají také příznivé účinky na organismus. V membráně fagocytů vzniká řetězovou reakcí kyselina chlorná, která se využívá k zabíjení fagocytovaných mikroorganismů. Peroxid vodíku je nezbytný pro oxidaci jodidu na elementární jod, který štítná žláza využívá k jodaci aromatických jader tyroninu. Příznivý účinek má i radikál oxid dusnatý, který má v endoteliálních buňkách výrazný vasodilatační efekt. S volnými radikály se můžeme setkat také v podobě signálních molekul (1).

## 2.2 TŘEZALKA TEČKOVANÁ

Drogu *Herba hyperici* poskytuje *Hypericum perforatum L.*, třezalka tečkovaná, z čeledi *Hypericaceae* (5).

### 2.2.1 Botanický popis

Třezalka tečkovaná se řadí mezi vytrvalé byliny s přímou lodyhou dorůstající výšky 30-90 cm (6). Roste hojně na travnatých slunných stanovištích, na mezích a u cest (7). Původně se vyskytovala v Evropě, Asii a Severní Americe, dnes je ale zavlečena i na ostatní kontinenty. Třezalka je výrazná zlatě žlutými kvítky, vyrůstajícími v bohatých vidličnatých latách, a sekrečními nádržky, které způsobují světlé tečkování listů, zřetelné hlavně v procházejícím světle, a upozorňující na druhové pojmenování (5). Vstříčné listy jsou přisedlé, vejčité a celokrajné. Černé tečky na okraji korunních plátků

a žlázy na zadní straně prašníků obsahují červené barvivo hypericin (7). Usušená nať *Hypericum perforatum* se sbírá krátce před kvetením nebo v květu (červenec, srpen) (5).

### 2.2.2 Obsahové látky

Nať obsahuje řadu sloučenin zahrnující naftodiantrony (0,05 – 0,30 %) s fotodynamickým účinkem (hypericin a pseudohypericin a jejich předstupně protohypericin proto-pseudohypericin). Vzájemný poměr těchto látek kolísá podle původu drogy. Dále obsahuje fluoroglucinolové deriváty (hyperforin a adhyperforin), flavonoidy (2 – 4 %) (kvercetin, hyperosid, rutin a isokvercetin), biflavonoidy (amentoflavon), hydroxyskořicové kyseliny (kyselina chlorogenová, kyselina kávová), proantocyanidiny, třísloviny (8 – 10 %), jejich obsah však skladováním silně klesá. Dalšími obsahovými látkami jsou xantin, aminokyseliny (GABA) a silice (0,05 – 0,3 %) (5, 8, 9, 10).

### 2.2.3 Farmakologické účinky

Lidově se třezalka tečkovaná užívala pro svůj rány hojící efekt, k léčbě gastrických ulcerací, jako antiseptická a sedativní látka (11). Dále se používala k léčbě zánětu průdušek a urogenitálního traktu, hemeroidech, migréně, bolesti hlavy, při diabetu mellitus a zánětech sedacího nervu. Uplatňovala se také jako diuretikum a antimalarikum (8).

V oficiální terapii se dnes používá jak droga tak i fytofarmaka z ní vyráběná. Droga, samotná nebo v čajových směsích, působí jako adstringens a antidiarhoikum (5). Fytofarmaka z třezalky tečkované se používají hlavně jako antidepresiva. Kontrolovanou klinickou studií byl prokázán účinek při terapii mírné deprese (9). Terapeutický efekt, při léčbě *Herba hyperici*, by se měl dostavit po 2 – 4 týdnech užívání. Pokud nedojde k výraznějšímu antidepresivnímu efektu do 6 týdnů, měla by být léčba konzultována s lékařem (8). Jedna ze studií provedená Butterweckem V. a kol. (12) ukazuje na srovnatelný efekt extraktu *Hypericum perforatum* a tricyklických

antidepresiv při léčbě mírné deprese. Autoři zde poukazují i na skutečnost lepší compliance pacientů užívající třezalkový extrakt oproti pacientům léčených syntetickým antidepresivem. Navíc antioxidační působení třezalky vede k hypotéze, zda není lepší než tricyklická antidepresiva nebo inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) (9). Studií bylo také prokázáno, že podávání *Herba hyperici* v lékové formě po dobu osmi týdnů, má stejný vliv na hypotalamus jako syntetické antidepresivum imipramin (12). Denní doporučená dávka při léčbě deprese ověřená studií je 500 mg extraktu a to odpovídá 1 – 2 mg hypericinu (6). Agostinisa P. a kol. (6) však ve své studii prokázali, že ne hypericin ale hyperforin je zodpovědný za antidepresivní aktivitu rostliny. Studie, zaměřená na mechanismus účinku *Hypericum perforatum* ve vztahu k mírnění deprese, zmiňuje fakt, že extrakt třezalky tečkované, hypericin, imipramin i fluoxetin významně zvyšují hladinu serotoninu v mozkové kůře potkanů po dlouhodobé léčbě trvající minimálně osm týdnů, ale ne po kratší době podávání (2 týdny) (12). Zvýšená hladina serotoninu může být způsobena inhibicí zpětného vychytávání serotoninu. Prací Panocka I. a kol. (13) a Benedí J. a kol. (3) byl prokázán vliv extraktu třezalky tečkované na zpětné vychytávání i na inhibici monoaminoxidázy (MAO), enzymu odbourávající serotonin.

Několik studií se zabývalo propojením deprese s abúzem alkoholu. Alkoholová závislost je jedním z hlavních zdravotních a socioekonomických problémů světa. Poznáním, že deprese a nadměrné pití alkoholu vede k podobným změnám aktivit neurotransmiterů, se pozornost obrátila na třezalku (13). Tato rostlina zvyšuje hladinu nejen serotoninových receptorů, ale také receptorů pro dopamin, norepinefrin a opioidních receptorů v CNS. Snížení patologického pití alkoholu při současném podávání léčiv se serotoninergním účinkem bylo prokázáno i u experimentálních zvířat (9).

Studie Khalifa A. E. (14) ukazuje potenciální nootropické vlastnosti třezalkového extraktu v dávkách ekvivalentních užívání jako antidepresiva. Jak už bylo zmíněno, sloučeniny zodpovědné za antidepresivní aktivitu, hypericin a hyperforin, zvyšují hladinu serotoninu a ten má ochranný efekt proti oxidativnímu poškození neuronů (3). Deprese je častým jevem u pacientů se senilní demencí. Studie na myších ukázala, že třezalkový extrakt je lepší alternativou při léčbě deprese spojené s demencí než podávání syntetických antidepresiv s anticholinergními účinky způsobující sedaci a posturální hypotenzi u geriatrických pacientů (14, 15, 3).

Experimentálně byla prokázána antimikrobiální aktivita proti Grampozitivním bakteriím (11). U hypericinu, jedné z obsahových látek třezalky tečkované, byl prokázán antivirový účinek, který by se mohl uplatnit při potenciální léčbě AIDS (6). Třezalka tečkovaná je v současné době podrobena vysokému zájmu po chemické i farmakologické stránce. Důvodem je snaha potvrdit terapeutický vliv na popáleniny, modřiny, podlitiny a otoky (16). Několika studii byl prokázán i protizánětlivý účinek třezalky tečkované. Ve studii Menegazzia M. a kol. (17) byl hodnocen vliv třezalky tečkované na zvířecí model s akutním zánětem pohrudnice. Extrakt rostliny redukuje rozvoj akutního zánětu, který je jinak doprovázen infiltrací neutrofilů, interleukinu 1 a zvýšenou produkcí tumor necrosis faktoru do místa zánětu. Flavonoidy obsažené v *Herba hyperici* mohou inhibovat cyklooxygenázu a tím modulovat metabolismus arachidonové kyseliny a rozvoj zánětu (18).

#### 2.2.4 Přípravky s obsahem třezalky tečkované

*Herba hyperici* je velmi využívanou drogou, o čemž svědčí množství vyráběných přípravků evidovaných v databázi AISLP (19). Setkáváme se s ní v různých lékových formách, jako jsou kapsle, tablety, globule, roztok, kapky, injekční roztoky, masti a čajové směsi. Suchý třezalkový extrakt je obsažen v přípravcích: Felis 425 (cps., Salutas Pharma GmbH, SRN), Felisio 425 (cps., Salutas Pharma GmbH, SRN), Helarium hypericum (tbl., Bionorica AG, SRN), Hypericum stada (cps., Stadapharm GmbH, SRN), Hyperikan (tbl., Dr. Willmar Schwabe GmbH\_CO, SRN), Klosterfrau hypericum (tbl., MCM Klosterfrau vertriebs GmbH, SRN), Myrall (cps., Stadapharm GmbH, SRN), Remotiv 250 (tbl., Ewopharma spol. s r. o. ČR a Max-Zeller Söhne Ag, Švýcarsko), Cesradyston 200 (cps., Cesra Arzneimittel GmbH\_CO, SRN) a Jarsin 300 (tbl., Lichtwer Pharma AG/GmbH, SRN).

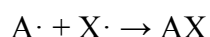
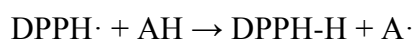
S drogou *Hyperici herba* se hojně setkáváme v čajových směsích: Alvisan Neo (Leros s.r.o., ČR), Fytokliman Planta (Leros s.r.o., ČR), Nař třezalky (Leros s.r.o., ČR), Species nervinae planta (Leros s.r.o., ČR), Stomaran (Leros s.r.o., ČR), Třezalka v nálevových sáčcích (Leros s.r.o., ČR), Třezalkový čaj (Megafyt-R s.r.o., ČR), Žaludeční čajová směs (Megafyt-R s.r.o., ČR).

S třezalkou se setkáváme také v homeopatických přípravcích: Hypericum (tbl., Radim Bakeš\_Galenická laboratoř Ostrava, ČR), Traumeel S (ung., Biologische Heilmittel Heel GmbH, SRN), Hypericum (glo., tbl., sol., Dr. Peithner KG, Rakousko) a v Hypericum perforatum (glo., Boiron S. A., Francie), Traumeel (gtt., tbt., Biologische Heilmittel Heel GmbH, SRN) a Dr. Reckeweg R30 (ung., Pharmazeutische Fabrik Dr. Reckeweg GmbH, SRN). Registrované je také veterinární homeopatikum Revet RV 25 A.U.V. (glo., inj., ., Pharmazeutische Fabrik Dr. Reckeweg GmbH, SRN).

## 2.3 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Vědci stále častěji vyhledávají nové a účinné antioxidanty v rozsáhlé rostlinné říši zahrnující ovoce, zeleninu, koření a léčivé rostliny. Izolace a chemická identifikace antioxidantů je velmi důležitá pro jejich využití v praxi jako potravních doplňků. Tento proces je velmi časově náročný a ne vždy vede k úspěšným výsledkům. Rozvoj efektivních metod, které by odhalily silné antioxidanty v rostlinném extraktu, může urychlit celý proces izolace a identifikace chemické struktury. Jednou z nejpoužívanějších metod pro stanovení antioxidační aktivity je metoda využívající radikálu 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH). Oproti jiným metodám má řadu výhod, mezi něž patří jednoduchost a možnost v krátkém čase proměřit více vzorků (20).

DPPH je stabilní volný radikál, který je schopen přijetím volného elektronu nebo vodíkového atomu transformovat se na radikál obtížně oxidovatelný. Reakce probíhá ve dvou stupních: v prvním reaguje radikál DPPH s antioxidantem (AH) z něhož se tak stává radikál, ten pak ve druhém stupni reaguje s dalším radikálem (stejným nebo jiným) a vzniká látka neradikálového charakteru.



Redukcí radikálu DPPH dochází ke snížení absorpce při vlnové délce 517 nm.

Při použití této metody se smíchá fialový roztok DPPH s roztokem vzorku, jehož aktivita je měřena, a po uplynutí doby inkubace se spektrofotometricky měří absorbance a porovnává s absorbancí roztoků samotného DPPH.

Výsledek se obvykle vyjadřuje jako % redukce DPPH a vypočítává podle vztahu:

$$\%redukceDPPH = \left(1 - \frac{A_{VZ}}{A_{SV}}\right) \cdot 100$$

kde  $A_{VZ}$  = absorbance testovacího vzorku po uplynutí doby inkubace

$A_{SV}$  = absorbance slepého vzorku po uplynutí doby inkubace

Provedení metody může být různé. Roztok DPPH může být metanolový nebo etanolový o různé koncentraci (0,1 mM, 0,2 mM a 1 mM). Také doba inkubace se v různých studiích liší (od 10-ti minut po 24 hodin). Absorbance se obvykle měří při 515 nebo 517 nm.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 POUŽITÝ MATERIÁL, PŘÍSTROJE A POMŮCKY

#### 3.1.1 Rostlinný materiál

Nať třezalky tečkované *Hyperici herba* byla získána sběrem v lokalitě Snina a Stropkov v Prešovském kraji ( Slovensko) a dodána prostřednictvím firmy Fytopharma Malacky.

#### 3.1.2 Chemikálie

Aqua purificata

Butan-2-on, p.a.

Difenylboryloxyetylamin = Naturstoff reagenz (CARLROTH, SRN)

Etanol, p.a.

Etylacetát, č.

Kyselina boritá, p.a.

Kyselina mravenčí bezvodá, p.a.

Kyselina octová bezvodá, p.a.

Kyselina octová ledová, p.a.

Kyselina šťavelová, p.a.

Metanol, p.a.

Tetrahydrofuran, p.a.

1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, SRN)



### 3.1.3 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy (KERN & SOHN GmbH, SRN)

Inkubační lázeň (HEIDOLPH, SRN)

Chromatografické desky SILUFOL (KAVALIER, Votice, ČR)

Laboratorní váhy (KERN & SOHN GmbH, SRN)

Mlýnek (MOULINEX)

Odstředivka (MPW 342, Polsko)

Spektrofotometr UV 1601 (SHIMADZU, Austrálie)

Sušárna (Binder, SRN)

Ultrazvuková lázeň (SONOREX RX 100H, SRN)

UV lampa (KRÜSS Optronic, SRN)

Vakuová odparka (Laborota 4010 Heidolph, SRN)

Vodní lázeň (GFL, SRN)

## 3.2 STANOVENÍ FLAVONOIDŮ

Stanovení flavonoidů bylo provedeno postupem daným v Českém lékopise 2002 dle článku *Crataegi folium cum flore* (21). Flavonoidy jsem stanovovala u každé drogy na tři navážky.

Při stanovení jsem připravila tři roztoky. Jednalo se o roztok základní, zkoušený a kontrolní. U základního roztoku jsem smíchala 0,400 g práškové drogy (250) se 40 ml lihu R 60 % (V/V) ve 200 ml baňce a zahřívala 10 minut na vodní lázni za častého protřepávání. Poté jsem obsah baňky přefiltrovala přes chomáček vaty do 100,0 ml odměrné baňky. Chomáček vaty jsem vložila zpět do 200 ml baňky, přidala 40 ml lihu R 60 % (V/V) a znovu zahřívala 10 minut na vodní lázni při 60 °C. Po ochlazení jsem obsah baňky znovu zfiltrovala do 100,0 ml odměrné baňky. 200ml baňku i filtr jsem promyla lihem R 60 % (V/V) a promývací tekutinu přidala do odměrné baňky. Spojené roztoky jsem doplnila lihem R 60 % (V/V) na 100,0 ml roztoku a ten jsem zfiltrovala.

Zkoušený roztok jsem připravila z roztoku základního, kdy jsem 5,0 ml základního roztoku odpařila v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek jsem

rozpustila v 8 ml směsi metanolu R a kyseliny octové ledové R (10+100) a převedla do 25,0 ml odměrné baňky. Baňku s kulatým dnem jsem promyla 3 ml směsi metanolu R a kyseliny octové ledové R (10+100) a promývací tekutinu jsem přidala do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku jsem přidala 10,0 ml roztoku kyseliny borité R (25,0 g/l) a kyseliny šťavelové R (20,0 g/l) v kyselině mravenčí bezvodé R a zředila kyselinou octovou bezvodou R na 25,0 ml.

K přípravě kontrolního roztoku jsem použila 5,0 ml základního roztoku, který jsem odpařila v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek jsem rozpustila v 8 ml směsi objemových dílů metanolu R a kyseliny octové ledové R (10+100) a převedla do 25,0 ml odměrné baňky. Baňku s kulatým dnem jsem promyla 3 ml směsi objemových dílů metanolu R a kyseliny octové ledové R (10+100) a promývací tekutinu jsem převedla do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku jsem přidala 10,0 ml kyseliny mravenčí bezvodé R a zředila kyselinou octovou bezvodou R na 25,0 ml.

Absorbanci zkoušeného roztoku jsem měřila po 30 minutách při 410 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ), jsem vypočítala podle vztahu  $\frac{A \cdot 1,235}{M}$ , kde  $A$  je absorbance roztoku v maximu při 410 nm a  $M$  je hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Výsledky měření stanovení flavonoidů udává tabulka č. 1.

### 3.3 STANOVENÍ HYPERICINŮ

Postupem udaným v Českém lékopise 2002 (21) v článku *Hyperici herba* jsem stanovila obsah hypericinů v droze. Pro každou drogu jsem provedla tři stanovení.

Zkoušený roztok jsem získala extrakcí 0,800 g práškové drogy se 60 ml směsi objemových dílů vody R a tetrahydrofuranu R (20+80). Směs jsem dala do 100 ml baňky s kulatým dnem a 30 minut vařila na vodní lázni při 70 °C pod zpětným chladičem. Poté jsem směs odstředila při 3500 otáček 2 minuty a supernatantní tekutinu jsem převedla do 250 ml baňky s kulatým dnem. Zbytek drogy jsem znovu zahřívala s 60 ml směsi objemových dílů vody R a tetrahydrofuranu R (20+80) 30 minut pod zpětným chladičem. Směs jsem znovu odstředila a supernatantní tekutinu odlila do

250 ml baňky s kulatým dnem k prvnímu podílu. Za sníženého tlaku jsem roztoky odpařila do sucha. Ke zbytku jsem přidala 15 ml metanolu R a za pomoci ultrazvuku jsem roztok převedla do 25,0 ml odměrné baňky, kterou jsem doplnila metanolem R. Opět jsem roztok odstředila a přefiltrovala přes filtr ze slinutého skla (0,2 μm), první 2 ml jsem odstranila a z přefiltrovaného roztoku jsem dala 5,0 ml filtrátu do 25,0 ml odměrné baňky a doplnila metanolem R.

Absorbanci zkoušeného roztoku jsem měřila při 590 nm za použití metanolu R jako kontrolní tekutiny. Obsah všech hypericinů v %, vyjádřeno jako hypericin (C<sub>30</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>), jsem vypočítala podle vzorce  $\frac{A \cdot 125}{m \cdot 870}$ , kde *A* je absorbance při 590 nm a *m* je navážka drogy v gramech. Lékopisné požadavky činí nejméně 0,08 % všech hypericinů, počítáno jako hypericin (C<sub>30</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>).

Výsledky měření stanovení hypericinů udává tabulka č. 2.

### 3.4 STANOVENÍ ZTRÁTY SUŠENÍM

Stanovení ztráty sušením jsem provedla postupem Českého lékopisu 2002 (21). Váženku i s víčkem jsem nechala asi 1 hodinu v sušárně při 100 – 105 °C. Váženku jsem poté nechala zchladnout v exsikátoru a zvážila. Váženku i s navážkou, která činila asi 0,6 g, jsem nechala 2 hodiny v sušárně při 100 – 105 °C. Poté jsem váženku znovu zvážila a vypočítala ztrátu sušením. Lékopis povoluje maximální ztrátu sušením 10 %. Pro každou drogu jsem provedla tři stanovení.

Výsledky stanovení jsou v tabulce č. 3.

### 3.5 STANOVENÍ ZBYTKU PO VYSUŠENÍ EXTRAKTŮ

Stanovení zbytku po vysušení extraktů jsem provedla postupem podle Českého lékopisu 2002 (21). Zahříváním 0,5 g drogy s 50 ml metanolu jsem připravila metanolový extrakt. Extrakt jsem zahřívala 30 minut při 65 °C, přefiltrovala do 50,0 ml odměrné

baňky a doplnila. Stejně tak jsem připravila vodný extrakt, jen místo metanolu jsem použila 50 ml vody.

2 ml zkoušeného extraktu jsem převedla do předem vysušené a zvážené váženky. Na vodní lázni jsem extrakt odpařila do sucha a zbytek jsem sušila 3 hodiny v sušárně při 100 – 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru jsem váženku opět zvažila a výsledek vyjádřila v g/l.

U každého vzorku drogy jsem provedla 2 stanovení zbytku po odpaření vodného extraktu a 2 stanovení zbytku po odpaření metanolového extraktu.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.4.

### 3.6 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

Antiradikálovou aktivitu jsem stanovovala spektrofotometrickou metodou využívající radikál 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH).

#### 3.6.1 Příprava roztoku DPPH

Připravila jsem si základní 0,2 % roztok DPPH, který jsem uchovávala v lednici. Navážila jsem 0,0500 g DPPH a kvantitativně převedla do 25,0 ml odměrné baňky a doplnila metanolem. K rozpuštění DPPH jsem použila ultrazvukovou lázeň, kde jsem roztok 5 minut ponechala. Ze základního roztoku jsem odměřila 5,0 ml a v 50,0 ml odměrné baňce doplnila metanolem po značku. Získala jsem 0,02 % roztok, který jsem používala ke stanovení.

#### 3.6.2 Příprava extraktů z drog

Antiradikálovou aktivitu jsem stanovovala u metanolového i vodného výluhu drogy a z každého vzorku drogy jsem připravila 3 výluhy metanolové a 3 vodné.

### 3.6.2.1 METANOLOVÝ EXTRAKT

Metanolvý výluh jsem připravila zahříváním 0,5 g drogy s 50 ml metanolu po dobu 30 minut při 65 °C. Směs jsem přefiltrovala do 50,0 ml odměrné baňky a doplnila do 50,0 ml metanolem. K vlastnímu měření jsem používala metanolvý extrakt, který jsem ještě 200x naředila. Z původního výluhu jsem odměřila 0,5 ml a ve 100,0 ml odměrné baňce jsem doplnila metanolem po značku.

### 3.6.2.2 VODNÝ EXTRAKT

Vodný výluh jsem připravila zahříváním 0,5 g drogy s 50 ml vody na vodní lázni pod zpětným chladičem při 65 °C po dobu 30 minut. Po vychladnutí jsem směs zfiltrovala do 50,0 ml odměrné baňky a doplnila na 50,0 ml vodou. Z odměrné baňky jsem odměřila 5,0 ml roztoku a za sníženého tlaku jsem jej odpařila do sucha. Zbytek jsem rozpustila ve 100,0 ml metanolu. Z tohoto metanolvého roztoku jsem připravila 100x ředěný roztok. 5,0 ml roztoku jsem doplnila ve 25,0 ml odměrné baňce metanolem po značku.

## 3.6.3 Stanovení antioxidační aktivity extraktů z drog

### 3.6.3.1 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY METANOLOVÝCH EXTRAKTŮ

#### 3.6.3.1.1 Stanovení antioxidační aktivity *Hyperici herba* z oblasti Snina

Při vlastním měření jsem odměřila 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,3; 1,5 a 1,6 ml metanolvého extraktu do 5,0 ml odměrných baněk. Přidala jsem 200 µl roztoku DPPH a doplnila metanolem do 5,0 ml. Obsah odměrných baněk jsem promíchala, odměrné baňky

uzavřela a ponechala 30 minut inkubovat v 37 °C teplé lázni. Po uplynutí požadovaného času jsem měřila absorbanci při vlnové délce 517 nm proti metanolu.

Současně jsem připravila slepý vzorek pro kontrolu. Slepý vzorek obsahoval 200 µl roztoku DPPH a metanol, kterým jsem odměrnou baňku doplnila na 5,0 ml.

Antioxidační aktivitu jsem vyjádřila v % redukce DPPH podle vztahu:

$$\% \text{redukce DPPH} = \left(1 - \frac{A_{VZ}}{A_{SV}}\right) \cdot 100$$

kde  $A_{VZ}$  = absorbance testovacího vzorku po uplynutí doby inkubace

$A_{SV}$  = absorbance slepého vzorku po uplynutí doby inkubace

Výsledky stanovení antioxidační aktivity drogy *Hyperici herba* z oblasti Snina uvádí tabulka č. 5.

#### 3.6.3.1.2 Stanovení antioxidační aktivity *Hyperici herba* z oblasti Sropkov

K měření antiradikálové aktivity drogy *Herba hyperici* z oblasti Stropkov jsem použila řadu: 0,1; 0,4; 0,7; 1,0; 1,3; 1,5 a 1,6 ml. Při měření jsem postupovala stejně jako u drogy z oblasti Snina.

Výsledky stanovení udává tabulka č. 6.

#### 3.6.3.1.3 Stanovení antioxidační aktivity rutinu

Rutin jsem získala semipreparativní tenkovrstvou chromatografií metanolového extraktu drogy ( 3.6.2.1.) na Silufolu. Nanášela jsem 250 µl metanolového výluhu do pruhu. Mobilní fází byla směs etylacetátu R, kyseliny mravenčí bezvodé R a vody R (90:6:9). Poté jsem desky z komory vyndala a nechala do druhého dne v digestoři odpařit mobilní fázi. Druhého dne jsem vyškrábala pás, který odpovídal rutinu, a eluovala s 5 ml metanolu pomocí ultrazvuku. Následně jsem směs přefiltrovala přes fritu a kvantitativně převedla do 5,0 ml odměrné baňky.

Pro stanovení antioxidační aktivity jsem k roztoku přidala 200  $\mu$ l roztoku DPPH a doplnila metanolem po značku. Odměrné baňky jsem zamíchala a uzavřené ponechala 30 minut inkubovat ve vodní lázni 37 °C teplé.

Při 517 nm jsem změřila absorbanci proti metanolu a antioxidační aktivitu vyjádřila v % redukce DPPH.

Výsledky stanovení AA eluátu rutinu z metanolového extraktu *Herba hyperici* oblasti Snina a Stropkov uvádí tabulky č. 8 a 9.

### 3.6.3.2 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY VODNÝCH EXTRAKTŮ

#### 3.6.3.2.1 Stanovení antioxidační aktivity *Hyperici herba* z oblasti Snina a Stropkov

Při měření antioxidační aktivity metanolového roztoku vodného extraktu jsem postupovala stejně jako u měření antioxidační aktivity metanolového extraktu. V obou případech jsem k měření antioxidační aktivity použila řadu: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 a 0,6 ml. Výsledky stanovení antioxidační aktivity metanolového roztoku vodného extraktu jsou v tabulce č. 5 a č. 6.

#### 3.6.3.2.2 Stanovení antioxidační aktivity rutinu

Semipreparativní tenkovrstvou chromatografií vodného extraktu drogy (nanášeno 250  $\mu$ l) jsem získala rutin postupem stejným jako u metanolového extraktu.

K metanolovému roztoku rutinu jsem přidala 200  $\mu$ l roztoku DPPH, doplnila do 5,0 ml metanolem a inkubovala 30 minut při teplotě 37 °C.

Výsledky stanovení vodného extraktu *Hyperici herba* z oblasti Snina a Stropkov uvádí tabulky č. 8 a 9.

## 3.7 TENKOVŘSTVÁ CHROMATOGRRAFIE

### 3.7.1 Důkaz hyperosidu, rutinu a kyseliny chlorogenové v metanolovém extraktu

Podle článku *Hyperici herba* v ČL 2002 (21) jsem si připravila zkoušený roztok. Navážila jsem 0,5 g práškové drogy a zahřívala ji s 10 ml metanolu na vodní lázni pod zpětným chladičem při 60 °C po dobu 10 minut. Směs jsem přefiltrovala a doplnila na 50,0 ml metanolem.

Jako stacionární fázi jsem použila Silufol bez UV indikátoru, dělicí dráha byla 10 cm dlouhá.

Mobilní fáze: S1: kyselina mravenčí bezvodá R, voda R, etyl-acetát R (6:9:90)  
S2: kyselina mravenčí bezvodá R, voda R, butan-2-on, etyl-acetát R (10:10:30:50)

Detekce: 1. Postřík roztokem difenylboryloxyetylaminu 1 % a po 30 minutách pozorování skvrn v UV světle při 365 nm.  
2. Postřík roztokem DPPH 0,2 % a následné prohlížení na denním světle.

Nanášky: SN – 10 µl metanolového extraktu drogy *Herba hyperici* z oblasti Snina  
STR – 10 µl metanolového extraktu drogy *Herba hyperici* z oblasti Stropkov  
H - 10 µl standardu hyperosidu 0,1 %  
R - 10 µl standardu rutinu 0,1 %  
KCH- 10 µl standardu kyseliny chlorogenové 0,1 %

Schéma chromatogramů je na obrázku č.1 a 2.



### 3.7.2 Důkaz hyperosidu, rutinu a kyseliny chlorogenové ve vodném extraktu

Vodný extrakt jsem připravila zahříváním 0,5 g drogy s 50 ml vody na vodní lázni při 65 °C 30 minut. Po ochlazení jsem směs zfiltrovala a doplnila do 50,0 ml vodou. Vodný extrakt jsem na vodní lázni zahustila asi na 30 % původního obsahu a nanášela jsem 20 µl extraktu.

Podmínky chromatografie uvádí kapitola 3.7.1.

Schéma chromatogramů jsou uvedena na obrázku č. 3 a 4.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

Tabulka č. 1: Stanovení obsahu flavonoidů *Hyperici herba*

Původ drogy	Navážka drogy ( g )	Absorbance	Obsah flavonoidů (%) Přepočteno na vysušenou drogu	Průměr (%)	Směrodatná odchylka
Stropkov	0,3772	1,188	3,890	3,904	0,013
	0,3773	1,194	3,908		
	0,3716	1,178	3,915		
Snina	0,3700	1,106	3,692	3,688	0,005
	0,3688	1,102	3,690		
	0,3722	1,110	3,683		

Tabulka č. 2: Stanovení obsahu hypericinů v *Hyperici herba*

Původ drogy	Navážka drogy ( g )	Absorbance	Obsah hypericinů (%) Přepočteno na vysušenou drogu	Průměr (%)	Směrodatná odchylka
Stropkov	0,7367	0,703	0,137	0,140	0,003
	0,7337	0,712	0,139		
	0,7360	0,729	0,142		
Snina	0,7363	0,666	0,130	0,127	0,003
	0,7398	0,635	0,123		
	0,7363	0,649	0,127		

Tabulka č. 3: Stanovení ztráty sušením

Droga	Navážka (g)	Ztráta hmotnosti (g) po 2 hod sušení	Ztráta sušením (%)	Průměr (%)	Směrodatná odchylka
Stropkov	0,6376	0,0530	8,312	8,249	0,064
	0,6244	0,0511	8,184		
	0,6096	0,0503	8,251		
Snina	0,6017	0,0481	7,994	7,997	0,639
	0,5222	0,0451	8,637		
	0,6006	0,0442	7,359		

Tabulka č. 4: Stanovení zbytku po vysušení extraktů

Typ extraktu	Oblast drogy	Navážka drogy (g/2 ml)	Hmotnost extraktu (g) po 3 hod sušení	Průměr (g)	Odparek (g/l)
Metanolvý	Snina	0,0201	0,0057	0,0057	2,85
			0,0057		
	Stropkov	0,0201	0,0064	0,0062	3,10
Vodný	Snina	0,0200	0,0064	0,0063	3,15
			0,0062		
	Stropkov	0,0200	0,0069	0,0070	3,50
			0,0071		

Tabulka č. 5 – Stanovení antioxidační aktivity drogy *Herba hyperici* (původ Snina)

Typ extraktu	Číslo vzorku	Objem vzorku (ml)	Vztaž. na odparek (µg)	A výluhu	A DPPH	% redukce DPPH	Průměr (%)	s
Metanolvý	1	0,3	4,3135	0,197	0,261	24,521	22,473	2,896
		0,3		0,187	0,235	20,426		
		0,5	7,1891	0,152	0,261	41,762	38,483	4,626
		0,5		0,157	0,235	33,191		
		0,5	10,0648	0,144	0,242	40,496	51,414	2,144
		0,7		0,121	0,261	53,640		
		0,7		0,119	0,235	49,362		
		0,7	14,3783	0,118	0,242	51,240	70,149	1,167
		1,0		0,075	0,261	71,264		
		1,0		0,073	0,235	68,936		
		1,0	18,6917	0,072	0,242	70,248	87,805	0,187
		1,3		0,032	0,261	87,739		
	1,3	0,029		0,235	87,660			
	1,3	21,5674	0,029	0,242	88,017	92,765	0,427	
	1,5		0,020	0,261	92,337			
	1,5		0,017	0,235	92,766			
	1,5	23,0052	0,016	0,235	93,191	93,191	0,000	
	1,6		0,016	0,235	93,191			
	1,6		0,016	0,235	93,191			
	2	0,3	4,2853	0,179	0,242	26,033	25,413	0,877
				0,3	0,182	0,242		
		0,5	7,1421	0,157	0,242	35,124	36,639	1,451
		0,5		0,150	0,242	38,017		
		0,5	9,9989	0,153	0,242	36,777	47,407	0,513
0,7		0,117		0,225	48,000			
0,7		0,119		0,225	47,111			
0,7		14,2842	0,119	0,225	47,111	64,741	1,358	
1,0			0,080	0,225	64,444			
1,0			0,076	0,225	66,222			
1,0		18,5695	0,082	0,225	63,556	84,296	1,026	
1,3			0,038	0,225	83,111			
1,3	0,034		0,225	84,889				
1,3		0,034	0,225	84,889				

Pokračování tabulky č. 5

Typ extraktu	Číslo vzorku	Objem vzorku (ml)	Vztaž. na odparek (µg)	A výluhu	A DPPH	% redukce DPPH	Průměr (%)	s		
		1,5	21,4263	0,020	0,225	91,111	91,361	0,227		
		1,5		0,019	0,225	91,556				
		1,5		0,020	0,233	91,416				
		1,6	22,8547	0,016	0,233	93,133	92,990	0,248		
		1,6		0,016	0,233	93,133				
		1,6		0,017	0,233	92,704				
		3	0,3	4,3143	0,152	0,233	34,764	31,044	3,250	
					0,3	0,166	0,233			28,755
					0,3	0,164	0,233			29,614
	0,5		7,1906	0,147	0,233	36,910	36,195	0,656		
				0,5	0,150	0,233			35,622	
				0,5	0,149	0,233			36,052	
	0,7		10,0668	0,120	0,233	48,498	48,178	0,277		
				0,7	0,118	0,227			48,018	
				0,7	0,118	0,227			48,018	
	1,0		14,3811	0,078	0,227	65,639	67,254	2,798		
				1,0	0,078	0,227			65,639	
				1,0	0,067	0,227			70,485	
	1,3		18,6954	0,039	0,227	82,819	84,141	1,322		
				1,3	0,033	0,227			85,463	
				1,3	0,036	0,227			84,141	
	1,5		21,5717	0,019	0,227	91,630	92,070	0,441		
				1,5	0,017	0,227			92,511	
				1,5	0,018	0,227			92,070	
	1,6	23,0098	0,021	0,228	90,789	91,374	0,506			
			1,6	0,019	0,228			91,667		
			1,6	0,019	0,228			91,667		
Vodný	1	0,1	3,1513	0,159	0,193	17,617	20,108	2,220		
				0,1	0,152	0,192			20,833	
				0,1	0,150	0,192			21,875	
		0,2	6,3025	0,126	0,192	34,375	36,285	2,105		
				0,2	0,118	0,192			38,542	
				0,2	0,123	0,192			35,938	
		0,3	9,4538	0,091	0,193	52,850	52,686	0,142		
				0,3	0,091	0,192			52,604	
				0,3	0,091	0,192			52,604	

## Pokračování tabulky č. 5

Typ extraktu	Číslo vzorku	Objem vzorku (ml)	Vztaž. na odparek ( $\mu\text{g}$ )	A výluhu	A DPPH	% redukce DPPH	Průměr (%)	s	
		0,4	12,6050	0,059	0,192	69,271	67,535	2,168	
		0,4		0,061	0,192	68,229			
		0,4		0,067	0,192	65,104			
		0,5	15,7563	0,044	0,193	77,202	79,409	2,169	
		0,5		0,040	0,195	79,487			
		0,5		0,036	0,195	81,538			
		0,6	18,9076	0,022	0,192	88,542	88,146	0,428	
		0,6		0,024	0,195	87,692			
		0,6		0,023	0,195	88,205			
	2	0,1	3,1544	0,127	0,155	18,065	17,699	1,422	
				0,1	0,130	0,155			16,129
				0,1	0,133	0,164			18,902
		0,2	6,3088	0,090	0,155	41,935	40,942	0,884	
				0,2	0,092	0,155			40,645
				0,2	0,098	0,164			40,244
		0,3	9,4632	0,066	0,155	57,419	56,538	1,982	
				0,3	0,069	0,164			57,927
				0,3	0,075	0,164			54,268
		0,4	12,6176	0,047	0,155	69,677	72,312	2,662	
				0,4	0,043	0,155			72,258
				0,4	0,041	0,164			75,000
0,5	15,7721	0,024	0,155	84,516	85,036	0,815			
		0,5	0,023	0,164			85,976		
		0,5	0,026	0,169			84,615		
0,6	18,9265	0,020	0,155	87,097	87,415	0,653			
		0,6	0,020	0,169			88,166		
		0,6	0,022	0,169			86,982		
3	0,1	3,1538	0,134	0,164	18,293	19,257	2,219		
			0,1	0,135	0,164			17,683	
			0,1	0,122	0,156			21,795	
	0,2	6,3076	0,096	0,156	38,462	39,283	0,713		
			0,2	0,094	0,156			39,744	
			0,2	0,102	0,169			39,645	

Pokračování tabulky č. 5

Typ extraktu	Číslo vzorku	Objem vzorku (ml)	Vztaž. na odparek ( $\mu\text{g}$ )	A výluhu	A DPPH	% redukce DPPH	Průměr (%)	s
		0,3	9,4613	0,070	0,156	55,128	56,920	1,730
		0,3		0,067	0,156	57,051		
		0,3		0,070	0,169	58,580		
		0,4	12,6151	0,042	0,156	73,077	73,932	0,979
		0,4		0,041	0,156	73,718		
		0,4		0,039	0,156	75,000		
		0,5	15,7689	0,023	0,156	85,256	85,815	1,011
		0,5		0,025	0,169	85,207		
		0,5		0,022	0,169	86,982		
		0,6	18,9227	0,020	0,169	88,166	88,363	0,342
		0,6		0,020	0,169	88,166		
		0,6		0,019	0,169	88,757		

Tabulka č. 6 – Stanovení antioxidační aktivity drogy *Herba hyperici* ( původ Stropkov)

Typ extraktu	Číslo vzorku	Objem vzorku (ml)	Vztaž. na odparek (µg)	A výluhu	A DPPH	% redukce DPPH	Průměr (%)	s
Metanolvý	1	0,1	1,5584	0,172	0,212	18,868	15,566	3,302
		0,1		0,179	0,212	15,566		
		0,1		0,186	0,212	12,264		
		0,4	6,2335	0,155	0,212	26,887	27,516	0,721
		0,4		0,152	0,212	28,302		
		0,4		0,154	0,212	27,358		
		0,7	10,9086	0,110	0,212	48,113	47,484	0,721
		0,7		0,111	0,212	47,642		
		0,7		0,113	0,212	46,698		
	1,0	15,5837	0,080	0,212	62,264	64,154	2,166	
	1,0		0,077	0,212	63,679			
	1,0		0,075	0,224	66,518			
	1,3	20,2588	0,040	0,224	82,143	83,185	1,435	
	1,3		0,039	0,224	82,589			
	1,3		0,034	0,224	84,821			
	1,5	23,3756	0,023	0,224	89,732	89,435	0,258	
	1,5		0,024	0,224	89,286			
	1,5		0,024	0,224	89,286			
	1,6	24,9339	0,019	0,224	91,518	91,667	0,258	
	1,6		0,018	0,224	91,964			
	1,6		0,019	0,224	91,518			
	2	0,1	1,5534	0,194	0,224	13,393	10,046	3,217
				0,194	0,215	9,767		
				0,200	0,215	6,977		
0,4		6,2136	0,144	0,215	33,023	30,543	2,148	
0,152			0,215	29,302				
0,152			0,215	29,302				
0,7		10,8739	0,113	0,215	47,442	47,442	0,000	
0,113			0,215	47,442				
0,113			0,215	47,442				
1,0		15,5341	0,076	0,215	64,651	64,031	1,495	
0,075			0,215	65,116				
0,081			0,215	62,326				
1,3		20,1943	0,045	0,224	79,911	81,548	1,568	
0,038			0,224	83,036				
0,041			0,224	81,696				



## Pokračování tabulky č. 6

Typ extraktu	Číslo vzorku	Objem vzorku (ml)	Vztaž. na odparek (μg)	A výluhu	A DPPH	% redukce DPPH	Průměr (%)	s	
		1,5	23,3012	0,022	0,224	90,179	90,179	0,000	
		1,5		0,022	0,224	90,179			
		1,5		0,022	0,224	90,179			
		1,6	24,8546	0,021	0,224	90,625	90,625	0,446	
		1,6		0,020	0,224	91,071			
		1,6		0,022	0,224	90,179			
		3	0,1	1,5565	0,205	0,224	8,482	8,955	0,449
					0,203	0,224	9,375		
					0,202	0,222	9,009		
	0,4		6,2260	0,156	0,222	29,730	29,730	0,901	
				0,158	0,222	28,829			
				0,154	0,222	30,631			
	0,7		10,8956	0,118	0,222	46,847	47,447	1,040	
				0,114	0,222	48,649			
				0,118	0,222	46,847			
	1,0		15,5651	0,080	0,222	63,964	63,964	0,901	
				0,082	0,222	63,063			
				0,078	0,222	64,865			
	1,3		20,2346	0,046	0,222	79,279	80,631	1,351	
				0,040	0,222	81,982			
				0,043	0,222	80,631			
	1,5		23,3477	0,029	0,222	86,937	87,688	0,688	
				0,027	0,222	87,838			
				0,026	0,222	88,288			
	1,6	24,9042	0,022	0,222	90,090	90,240	0,260		
			0,021	0,222	90,541				
			0,022	0,222	90,090				
Vodný	1	0,1	3,5091	0,168	0,208	19,231	16,563	3,823	
				0,173	0,197	12,183			
				0,161	0,197	18,274			
		0,2	7,0182	0,132	0,208	36,538	33,161	4,223	
				0,129	0,197	34,518			
				0,141	0,197	28,426			
		0,3	10,5273	0,110	0,208	47,115	47,854	1,652	
				0,105	0,197	46,701			
				0,099	0,197	49,746			

Pokračování tabulky č. 6

Typ extraktu	Číslo vzorku	Objem vzorku (ml)	Vztaž. na odparek (µg)	A výluhu	A DPPH	% redukce DPPH	Průměr (%)	s		
		0,4	14,0364	0,070	0,208	66,346	64,055	2,814		
		0,4		0,077	0,197	60,914				
		0,4		0,073	0,208	64,904				
			2	0,5	17,5455	0,057	0,208	72,596	75,468	2,500
				0,5		0,045	0,197	77,157		
				0,5		0,046	0,197	76,650		
				0,6	21,0546	0,028	0,208	86,538	84,936	1,469
				0,6		0,034	0,208	83,654		
				0,6		0,032	0,208	84,615		
		2	0,1	3,5154	0,176	0,208	15,385	17,308	1,733	
			0,1		0,169	0,208	18,750			
			0,1		0,171	0,208	17,788			
				0,2	7,0308	0,134	0,208	35,577	36,058	3,630
				0,2		0,140	0,208	32,692		
				0,2		0,125	0,208	39,904		
				0,3	10,5462	0,110	0,208	47,115	47,436	1,469
				0,3		0,112	0,208	46,154		
				0,3		0,106	0,208	49,038		
				0,4	14,0616	0,086	0,208	58,654	58,173	1,272
				0,4		0,085	0,208	59,135		
				0,4		0,090	0,208	56,731		
				0,5	17,5770	0,043	0,208	79,327	77,083	2,168
				0,5		0,048	0,208	76,923		
				0,5		0,052	0,208	75,000		
			0,6	21,0924	0,039	0,208	81,250	82,692	2,924	
			0,6		0,029	0,208	86,058			
			0,6		0,040	0,208	80,769			
	3	0,1	3,5049	0,170	0,207	17,874	17,965	0,810		
		0,1		0,154	0,186	17,204				
		0,1		0,151	0,186	18,817				
			0,2	7,0098	0,139	0,207	32,850	33,710	0,792	
			0,2		0,123	0,186	33,871			
			0,2		0,122	0,186	34,409			

Pokračování tabulky č. 6

Typ extraktu	Číslo vzorku	Objem vzorku (ml)	Vztaž. na odparek (μg)	A výluhu	A DPPH	% redukce DPPH	Průměr (%)	s
		0,3	10,5147	0,105	0,207	49,275	50,655	2,698
		0,3		0,095	0,186	48,925		
		0,3		0,086	0,186	53,763		
		0,4	14,0196	0,080	0,207	61,353	61,670	0,604
		0,4		0,070	0,186	62,366		
		0,4		0,072	0,186	61,290		
		0,5	17,5245	0,051	0,207	75,362	74,583	2,254
		0,5		0,052	0,186	72,043		
		0,5		0,044	0,186	76,344		
		0,6	21,0294	0,045	0,207	78,261	83,819	5,064
		0,6		0,031	0,207	85,024		
		0,6		0,022	0,186	88,172		

Tabulka č. 7: Srovnání průměrné antioxidační aktivity extraktů z drog různého původu.

Původ drogy	Typ extraktu	Hmotnost vztažená na odparek (μg)	% redukce DPPH	s	IC 50 (μg/ml)
Snina	metanolvý	4,3044	26,987	2,341	9,8927
		7,1739	37,106	2,244	
		10,0435	49,000	0,978	
		14,3479	67,381	1,774	
		18,6522	85,414	0,845	
		21,5218	92,065	0,365	
		22,9566	92,518	0,251	
	vodný	3,1532	19,021	1,954	9,9697
		6,3063	38,837	1,234	
		9,4594	55,381	1,285	
		12,6126	71,259	1,936	
		15,7658	83,420	1,332	
		18,9189	87,975	0,474	
		Stropkov	metanolvý	1,5561	
6,2244	29,263			1,257	
10,8927	47,458			0,587	
15,5610	64,050			1,521	
20,2292	81,788			1,451	
23,3415	89,100			0,315	
24,8976	90,844			0,321	
vodný	3,5098		17,278	2,122	11,3659
	7,0196		34,309	2,882	
	10,5294		48,648	2,425	
	14,0392		61,299	1,563	
	17,5490		75,711	2,307	
	21,0588		83,816	2,667	

Tabulka č. 8: Stanovení antioxidační aktivity eluátu rutinu z metanolového a vodného extraktu *Hyperici herba* (původ Snina). (Kontrola – hodnoty pro eluát odpovídající velikosti z chromatografické desky, který nepřišel do styku se vzorkem.)

Typ extraktu	Číslo vzorku	Objem vzorku (μl)	Vztaž. na odparek (mg)	A výluhu	A DPPH	% redukce DPPH	Průměr (%)	s
metanolový	1	250,0	2,5225	0,067	0,206	67,476	69,094	4,129
				0,070	0,206	66,019		
				0,054	0,206	73,786		
	2	250,0	2,5060	0,025	0,206	87,864	87,540	1,962
0,030				0,206	85,437			
0,022				0,206	89,320			
3	250,0	2,5230	0,046	0,206	77,670	82,686	4,405	
			0,032	0,206	84,466			
			0,029	0,206	85,922			
	kontrola			0,197	0,206	4,369		
vodný	1	250,0	2,5001	0,043	0,187	77,005	81,640	7,121
				0,041	0,187	78,075		
				0,019	0,187	89,840		
	2	250,0	2,5035	0,040	0,159	74,843	71,279	6,725
0,039				0,159	75,472			
0,058				0,159	63,522			
3	250,0	2,5030	0,055	0,159	65,409	72,746	6,424	
			0,039	0,159	75,472			
			0,036	0,159	77,358			
	kontrola			0,161	0,187	13,904		

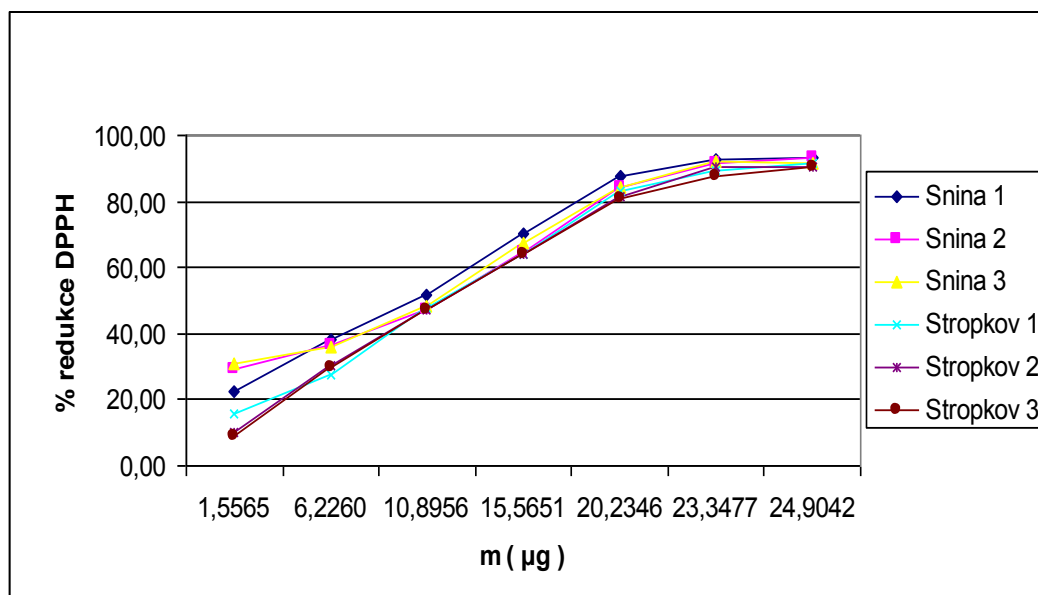
Typ extraktu	Číslo vzorku	Redukce DPPH rutinu (%)	Redukce DPPH kontrola (%)	Redukce DPPH rutinu zmenšená o kontrolu (%)
metanolový	1	79,773	4,369	75,404
	2			
	3			
vodný	1	75,222	13,904	61,318
	2			
	3			

Tabulka č. 9: Stanovení antioxidační aktivity eluátu rutinu z metanolového a vodného extraktu *Herba hyperici* (původ Stropkov). (Kontrola – hodnoty pro eluát odpovídající velikosti z chromatografické desky, který nepřišel do styku se vzorkem.)

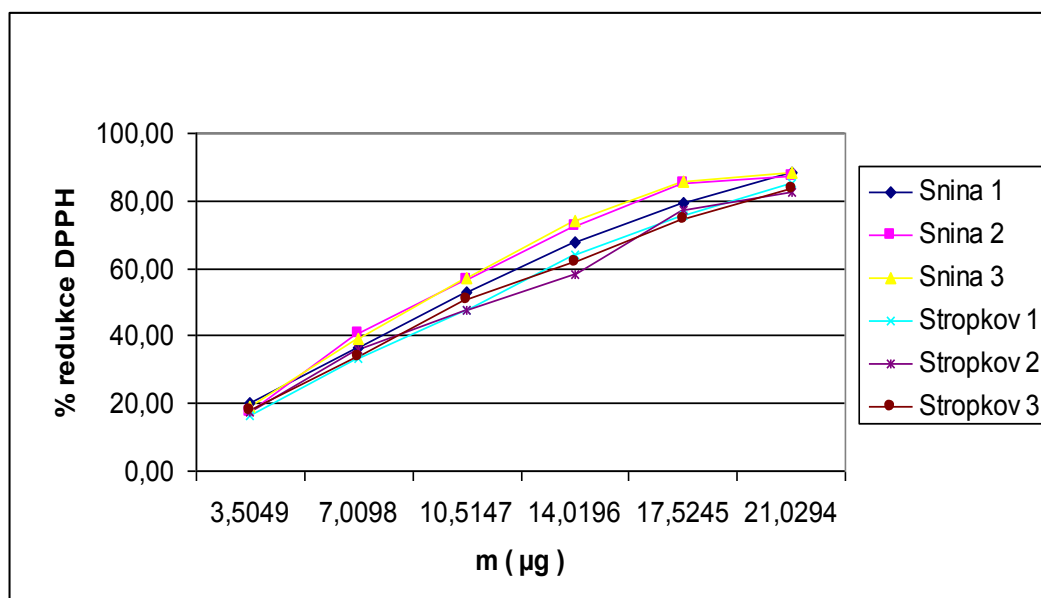
Typ extraktu	Číslo vzorku	Objem vzorku (μl)	Vztaž. na odparek (mg)	A výluhu	A DPPH	% redukce DPPH	Průměr (%)	s
metanolový	1	250,0	2,5135	0,070	0,223	68,610	73,094	5,287
				0,047	0,223	78,924		
				0,063	0,223	71,749		
	2	250,0	2,5055	0,035	0,223	84,305	81,166	3,386
0,041				0,223	81,614			
0,050				0,223	77,578			
3	250,0	2,5105	0,030	0,223	86,547	86,398	0,259	
			0,031	0,223	86,099			
			0,030	0,223	86,547			
	kontrola			0,197	0,223	11,659		
vodný	1	250,0	2,5065	0,057	0,152	62,500	55,482	6,113
				0,074	0,152	51,316		
				0,072	0,152	52,632		
	2	250,0	2,5110	0,054	0,152	64,474	57,895	6,276
0,073				0,152	51,974			
0,065				0,152	57,237			
3	250,0	2,5035	0,063	0,152	58,553	60,746	4,981	
			0,065	0,152	57,237			
			0,051	0,152	66,447			
	kontrola			0,135	0,152	11,184		

Typ extraktu	Číslo vzorku	Redukce DPPH rutinu (%)	Redukce DPPH kontrola (%)	Redukce DPPH rutinu zmenšená o kontrolu (%)
metanolový	1	80,219	11,659	68,560
	2			
	3			
vodný	1	58,041	11,184	46,857
	2			
	3			

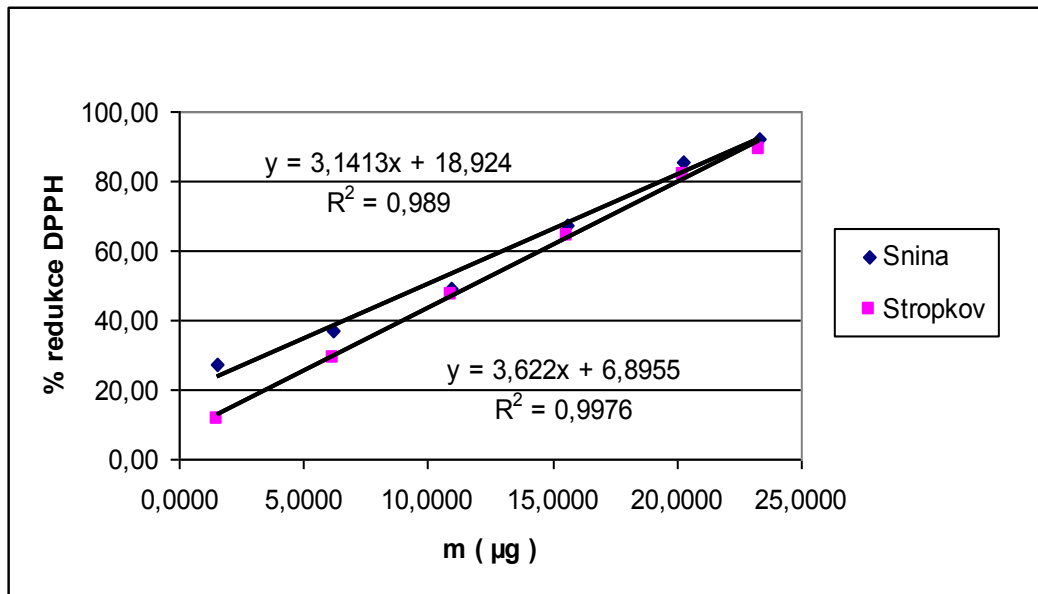
Graf č. 1: Antioxidační aktivita metanolových extraktů



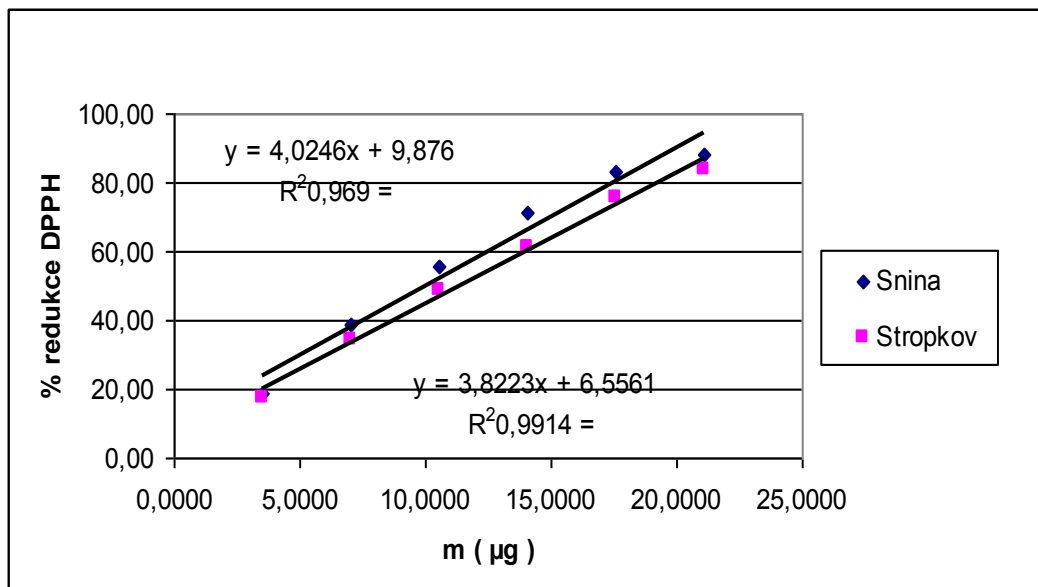
Graf č. 2: Antioxidační aktivita metanolových roztoků vodních extraktů



Graf č. 3: Graf lineární regrese antioxidační aktivity metanolového extraktu



Graf č. 4: Graf lineární regrese antioxidační aktivity metanolového roztoku vodného extraktu






























## 4.2 TENKOVRSŤVÁ CHROMATOGRRAFIE














Obrázek č. 1: Schéma chromatogramu metanolového extraktu po postříku difenylboryloxyetylaminem 1 %.

Mobilní fáze S1: kyselina mravenčí bezvodá R, voda R, etyl-acetát R (6:9:90)

	 R <sub>f</sub>	 R <sub>f</sub>	 R <sub>f</sub>	 R <sub>f</sub>
červená	 0,98	 0,98		
červená	 0,82	 0,82		
zelená	 0,76	 0,75		
červená	 0,70	 0,69		
červená	 0,60	 0,61		
zelená	 0,26	 0,28		
oranžová	 0,17	 0,19	 0,17	
oranžová	 0,05	 0,05		 0,07
červená	 0,00	 0,00	 0,00	
	Snina	Stropkov	Hyperosid	Rutin













Pokračování obrázku č. 1.

Mobilní fáze S2: kyselina mravenčí bezvodá R, voda R, butan-2-on, etyl-acetát R  
(10:10:30:50)









	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>
červená	 1,00	 1,00			
červená	 0,96	 0,96			
zelená	 0,58	 0,58			 0,62
oranžová	 0,47	 0,47	 0,47		
oranžová	 0,25	 0,25		 0,25	
	Snina	Stropkov	Hyperosid	Rutin	Kys. chlorogenová

Obrázek č. 2: Schéma chromatogramu metanolového extraktu po postříku roztokem DPPH 0,2 %.

Mobilní fáze S1: kyselina mravenčí bezvodá R, voda R, etyl-acetát R (6:9:90)











	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>
žlutá	 0,71	 0,71		
žlutá	 0,50	 0,50		
žlutá	 0,32	 0,34		
žlutá	 0,24	 0,24	 0,23	
žlutá	 0,07	 0,07		 0,08
	Snina	Stropkov	Hyperosid	Rutin

Mobilní fáze S2: kyselina mravenčí bezvodá R, voda R, butan-2-on, etyl-acetát R (10:10:30:50)










	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>
žlutá	 0,73	 0,75			
žlutá	 0,50	 0,51	 0,50		
žlutá	 0,28	 0,29		 0,31	
	Snina	Stropkov	Hyperosid	Rutin	Kys. chlorogenová

Obrázek č. 3: Schéma chromatogramu metanolového roztoku vodného extraktu po postřiku difenylboryloxyetylaminem 1 %.

Mobilní fáze S1: kyselina mravenčí bezvodá R, voda R, etyl-acetát R (6:9:90)









	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>
červená	 0,79	 0,77		
modrozelená	 0,46	 0,47		
žlutá	 0,32	 0,35	 0,31	
žlutá	 0,10	 0,15		 0,13
	Snina	Stropkov	Hyperosid	Rutin

Mobilní fáze S2: kyselina mravenčí bezvodá R, voda R, butan-2-on, etyl-acetát R (10:10:30:50)









	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>
modrozelená	 0,65	 0,66			 0,63
žlutá	 0,55	 0,55	 0,53		
žlutá	 0,35	 0,36		 0,35	
	Snina	Stropkov	Hyperosid	Rutin	Kys. chlorogenová

Obrázek č. 4: Schéma chromatogramu metanolového roztoku vodného extraktu po postřiku roztokem DPPH 0,2 %.

Mobilní fáze S1: kyselina mravenčí bezvodá R, voda R, etyl-acetát R (6:9:90)

	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>
modrozelená	 0,45	 0,47		
žlutá	 0,35	 0,38	 0,30	
žlutá	 0,12	 0,15		 0,13
	Snina	Stropkov	Hyperosid	Rutin

Mobilní fáze S2: kyselina mravenčí bezvodá R, voda R, butan-2-on, etyl-acetát R (10:10:30:50)

	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>	R <sub>f</sub>
modrozelená	 0,45	 0,47			
žlutá	 0,35	 0,38	 0,30		
žlutá	 0,12	 0,15		 0,13	
	Snina	Stropkov	Hyperosid	Rutin	Kys. chlorogenová

## 5 DISKUSE

Třezalka tečkovaná se stala významným předmětem zájmu vědců zkoumajících antioxidační aktivitu. Tato široce rozšířená léčivá rostlina obsahuje mnoho sloučenin s dokumentovanou biologickou aktivitou, zahrnující flavonoidy, naftodiantrony, fluoroglucinoly, proantocyanidiny, xanthony a silici (22). Stala se jedním z nejpůlárnějších rostlinných přípravků v USA a také v Evropě (23). Toto prvenství je dáno hlavně klinicky prokázaným účinkem při terapii mírné deprese.

Zvýšený zájem o *Hypericum perforatum* je dán také díky jejím antioxidačním a antiradikálovým vlastnostem. Výsledky studie, kterou provedli Hunt E. J. a kol. (24) ukázaly na inhibici volných radikálů produkovaných v jednotlivých buňkách i cévních tkáních pomocí extraktu z třezalky. Vysoká atioxidační aktivita byla prokázána u řady bulharských léčivých rostlin, mezi něž patří také třezalka tečkovaná, ve studii Ivanova D. a kol. (25). Antioxidační potenciál extraktů *Hypericum perforatum* a jejích částí je hodnocen na základě obsahu fenolických sloučenin (2). Více jak 57 % všech fenolických sloučenin přítomných v extraktu jsou flavonoidy, hlavně kvercetin a jeho glykosidy. Na základě studií bylo potvrzeno, že právě tento typ sloučenin je nejvýznamnějším antioxidantem. Mají strukturální aspekty určující vysoký antioxidační potenciál (2). Rozdíly ve struktuře a substituci flavonoidů mají za následek různé antioxidační schopnosti flavonoidů (26). Studie (2) (11) a (27) se shodly na vlivu volných OH- skupin fenolických sloučenin na AA. Významně zvýšená antioxidační a antiradikálová aktivita je v případě substituce kruhu C OH skupinou v poloze 3 a 5 a navíc dvojná vazba v poloze 2,3 je v konjugaci s oxo skupinou v poloze 4. Podle výsledků získaných ze studie Zou Y. a kol. (28), může být antioxidační mechanismus třezalky tečkované připisován schopnosti zhaset volné radikály, vázat (chelátovat) kovy a schopnosti zhaset reaktivní kyslíkaté sloučeniny. Studie (2) hodnotící antioxidační potenciál etanolového extraktu *Hypericum perforatum* zaznamenala výrazné snížení lipidové peroxidace. Flavonoidní aglykony pak byly označeny za hlavní aktéry antioxidačního účinku extraktu a ochrany proti lipidové peroxidaci. Hypericin a hyperforin nemají významnější podíl na antioxidačních vlastnostech. Studie také upozorňuje na konzumaci třezalky tečkované a farmaceutických produktů zahrnující potravní doplňky s antioxidačním efektem s prospěšným vlivem na zdraví. K tomuto konstatování se přidává také studie Wach A. a kol. (29).

Peroxidaci lipidových membrán liposomů v sérii *in vitro* testů bránil extrakt *Hypericum perforatum* bohatý na flavonoidy. Výsledkem této studie (28) bylo prokázání schopnosti zametat volné radikály a antioxidační vlastnosti třezalky tečkované a návrh přípravků s obsahem třezalky tečkované pro léčbu onemocnění postihující srdce. Ovšem studie Peeblesa K. A. a kol. (23) zdůrazňuje schopnost třezalkového extraktu interagovat s jinými léčivy. Hlavně díky sloučeninám hypericin a hyperforin, které indukují cytochrom P 450 jeho izoformy 1A2 a 3A4. Dochází tak ke změně metabolismu léčiv odbourávaných tímto enzymem (např. warfarinu, teofylinových přípravků, felodipinu, statinů).

Pro inhibici lipidové peroxidace, schopnost zhaset hydroxylový radikál a pro vzájemné působení s volným radikálem DPPH se studie Benedí J. a kol. (3) zaměřila na standardizovaný extrakt třezalky tečkované. Výsledky ukazují na zhasení DPPH radikálu v závislosti na množství extraktu. Byla zjištěna  $IC_{50}$  109  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , která odpovídá standardizovanému extraktu s obsahem 0,3 % hypericinů. To také potvrdila studie (30). Na množství extraktu je také závislá prokázaná inhibice enzymové i neenzymové peroxidace v mozkové kůře potkana. Skutečnost, že aktivita volných radikálů a lipidová peroxidace mohou být zahrnuty do tvorby a rozvoje neurodegenerativních poruch, nastolila otázku, zda-li i jiné neurologické stavy, zahrnující deprese, mohou být ovlivněny reaktivními sloučeninami kyslíku. Proto také byly zhodnoceny antioxidační vlastnosti tradičních antidepresiv. Výsledkem je, že klorgylin a deprenyl významně inhibují hydroxylový radikál. Studie ukazuje také na zjevnou inhibiční aktivitu třezalky zhaset reaktivní formy kyslíku, ale i na schopnost zhaset reaktivní formy dusíku. Studie Luo L. a kol. (16) to také dokazuje. NO-syntáza katalyzuje oxidaci guanidinu na L-arginin za tvorby NO. NO může reagovat se superoxidovým radikálem  $\text{O}_2\cdot^-$  za vzniku vysoce reaktivního peroxynitritu  $\text{ONOO}^-$ , který hraje roli v buněčném poškození nebo zničení buněk. Luo L. a kol. (16) zjišťoval pravděpodobný inhibiční efekt flavonoidů třezalky tečkované na NO-syntázu. Kvercetin a hyperosid byly neaktivnějšími sloučeninami. Naopak kvercitrin a rutin neukázaly žádný inhibiční efekt. Včasným a opakovaným užitím inhibitoru NO-syntázy byl zaznamenán ochranný vliv na CNS. Kvercetin a jeho glykosid hyperosid (kvercetin 3-O- $\beta$  galaktosid) byly dále studovány na zvířecích modelech. Výsledky ukázaly, že kvercetin je neselektivní inhibitor všech tří izoform NO-syntázy, endoteliální, neuronové i indukované. Hyperosid prokázal svoji selektivitu na zvýšené inhibici

neuronové NO-syntázy. Ze závěru studie plyne vztah mezi inhibicí NO-syntázy a antidepressivním účinkem flavonoidů (kvercetin a hyperosid) z *Hypericum perforatum*. Některé studie ukazují, že léčivé rostliny mají ochranný efekt proti buněčné smrti neuronů způsobené oxidativním stresem. Léčba třezalkou tečkovanou inhibuje peroxidem vodíku indukované zvýšení aktivity enzymu kaspáza-3, který hraje důležitou roli v apoptóze buňky. Významný neuroprotektivní efekt *Hypericum perforatum* proti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukované apoptóze v lidské buněčné linii neuronových buněk byl prokázán studií Janga M. H. a kol. (31).

Studie (11) se zabývala vztahem rozpustnosti sloučenin v reakčním prostředí a jejich aktivitou. Rozpustnost aglykonu v emulzi je větší než glykosidu, který si přirozeně vybere vodnou fázi v emulzi typu olej ve vodě. Vysoká AA biapigeninu a hypericinu (aglykony) je přisuzována jejich rozpustnosti v olejové fázi. Zjištění, že volné OH skupiny ve fenolických sloučeninách jsou nejvíce zodpovědné za AA, je potvrzeno skutečností, že biapigenin a hypericin obsahují více OH skupin než jiné sloučeniny izolované z etylacetátové frakce metanolového extraktu *Hypericum hyssopifolium*.

Cílem mé práce bylo zjistit antioxidační aktivitu a schopnost zhášet volné radikály *in vitro* u extraktů z *Herba hyperici*. K dispozici jsem měla nat' *Hypericum perforatum* ze dvou oblastí Prešovského kraje (Slovensko), Snina a Stropkov. Antioxidační aktivitu jsem stanovovala metodou zhášení radikálu DPPH. Spektrofotometricky jsem měřila pokles absorbance roztoku při vlnové délce 517 nm. Antioxidační aktivita se vyjadřuje jako % redukce DPPH podle vzorce:

$$\% \text{redukce DPPH} = \left(1 - \frac{A_{VZ}}{A_{SV}}\right) \cdot 100$$

kde  $A_{VZ}$  = absorbance testovacího vzorku po uplynutí doby inkubace

$A_{SV}$  = absorbance slepého vzorku po uplynutí doby inkubace

nebo hodnotou IC<sub>50</sub>, což odpovídá navážce vzorku nebo koncentraci extraktu, která způsobí pokles absorbance DPPH na 50 %.

Metodou jsem stanovovala AA vodného a metanolového extraktu z nati. Protože z literatury je známo, že na AA se podílejí flavonoidy, stanovila jsem jejich množství v droze. Stanovení jsem provedla postupem podle ČL 2002 článku *Crataegi folium cum flore* (21). Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení reakčních produktů s kyselinou boritou a šřavelovou. Výsledky uvádí tabulka č.1. Obsah flavonoidů, přepočtený na vysušenou drogu a vyjádřený v % hyperosidu, je u nati v rozmezí



3,688 ± 0,005 až 3,904 ± 0,013 %. Český lékopis 2002 (21) konkrétní obsah flavonoidů neuvádí, podle literárních údajů může být v droze 2 – 4 % flavonoidů (8). Jak vyplývá z výsledků stanovení, je analyzovaná droga z hlediska obsahu flavonoidů velmi kvalitní. Kvalita drogy je podle lékopisu posuzována podle obsahu hypericinů. Obsah hypericinu stanoveného podle ČL 2002 článku *Hyperici herba* (21) udává tabulka č. 2. Obsah v analyzovaných vzorcích, počítáno na vysušenou drogu, je 0,140 ± 0,003 až 0,127 ± 0,003 %. Požadavek lékopisu (21) je nejméně 0,08 % hypericinů, počítáno jako hypericin, i tento ukazatel analyzované vzorky několikanásobně převyšují.

U třezalky z oblasti Snina byl stanoven nižší obsah flavonoidů i nižší obsah hypericinů. Rozdíl v množství sekundárních metabolitů u *Hypericum perforatum* pěstovaných v různých lokalitách se zabývá studie (32). Autor studie poukazuje na silný genetický vliv, na klimatické faktory, nadmořskou výšku, sluneční svit, geografickou polohu, složení půdy.

Výsledky zjištěné antioxidační aktivity *Herba hyperici* uvádí tabulka č. 5-7 a grafy č. 1-2. Vodné a metanolové extrakty drogy z oblasti Snina prokázaly jen nepatrně vyšší antioxidační aktivitu než extrakty drogy z oblasti Stropkov.

Při porovnání hodnot IC<sub>50</sub> (množství drogy v µg, které způsobuje pokles absorbance DPPH na 50 %) vyplývá, že mezi vzorky nejsou výrazné rozdíly. IC<sub>50</sub> analyzovaných vzorků se pohybuje v rozmezí 9,8927 – 11,9007 µg/ml. Konkrétní hodnoty IC<sub>50</sub> uvádí tabulka č. 7. Hodnota IC<sub>50</sub> publikovaná v literatuře, pro standardizovaný extrakt s obsahem 0,3 % hypericinů, je 109 µg/ml (3).

Tenkovrstvou chromatografií byly v extraktech (metanolovém i vodném) dokazovány látky pravděpodobně zodpovědné za antioxidační aktivitu, a to především flavonoidy. Jako mobilní fáze byly pro TLC použity kyselina mravenčí bezvodá R, voda R, etyl-acetát R (6:9:90) a kyselina mravenčí bezvodá R, voda R, butan-2-on, etyl-acetát R (10:10:30:50), nejčastěji používané při chromatografii flavonoidních drog. Detekce byla provedena postupem ČL 2002 (21) postříkem s roztokem difenylboryloxyetylaminu 1 %. K důkazu antioxidačně působících látek byla deska chromatogramu po důkladném odvětrání zbytků rozpouštědel postříkána roztokem radikálu DPPH 0,2 %. Antioxidačně působící látky se projeví žlutým zbarvením na fialovém pozadí. Schéma chromatogramu je na obr. č. 1 – 4. Nejvýraznější skvrna, která odpovídala rutině, byla dále hodnocena.

Ze souboru látek přítomných v metanolovém i vodném extraktu z drogy byla skvrna rutině separována semipreparativní tenkovrstvou chromatografií. V eluátu skvrny byla

měřena antioxidační aktivita reakcí s DPPH radikálem, od hodnoty antioxidační aktivity skvrny rutinu byla odečtena hodnota antioxidační aktivity eluátu z čisté chromatografické desky (v tab. 8 a 9 označeno jako kontrola). Výsledky měření udává tabulka č. 8 a 9. Do metanolového extraktu přejde patrně více látky z drogy než do vodného extraktu. Antioxidační aktivita rutinu získaného z extraktů drogy ze Sniny byla 61,318 % resp. 75,404 % redukce DPPH, u rutinu získaného z extraktů drogy původu ze Stropkova byla antioxidační aktivita 46,857 % resp. 68,560 % redukce DPPH.

## 6 ZÁVĚR

Metodou založenou na zhášení radikálu DPPH byla spektrofotometricky stanovena antioxidační aktivita extraktů z drogy *Hyperici herba* pocházející ze sběru ve dvou různých lokalitách.

Analyzovány byly vodné a metanolové extrakty.

Porovnání hodnot  $IC_{50}$  ukazuje jen nevýrazné rozdíly v antioxidační aktivitě v pořadí: metanolový extrakt drogy z oblasti Snina ( $9,8927 \mu\text{g/ml}$ ) > vodný extrakt drogy z oblasti Snina ( $9,9697 \mu\text{g/ml}$ ) > vodný extrakt drogy z oblasti Stropkov ( $11,3659 \mu\text{g/ml}$ ) > metanolový extrakt drogy z oblasti Stropkov ( $11,9007 \mu\text{g/ml}$ ).

Tenkovrstvou chromatografií byly v metanolovém i vodném extraktu dokázány flavonoidy. Obsah flavonoidů byl u drogy původu Stropkov  $3,904 \pm 0,013 \%$  a drogy původu Snina  $3,688 \pm 0,005 \%$  přepočteno na vysušenou drogu. Obsah hypericinů byl u drogy z lokality Stropkov  $0,140 \pm 0,003 \%$  a u drogy z lokality Snina  $0,127 \pm 0,003 \%$  přepočteno na vysušenou drogu.

U rutinu získaného z extraktů semipreparativní tenkovrstvou chromatografií byla zjištěna antioxidační aktivita v pořadí: metanolový extrakt drogy z oblasti Snina > metanolový extrakt drogy z oblasti Stropkov > vodný extrakt drogy z oblasti Snina > vodný extrakt drogy z oblasti Stropkov.

Antioxidační aktivita rutinu získaného z extraktů semipreparativní tenkovrstvou chromatografií dosahovala v závislosti na použitém extrakčním rozpouštědle a původu vzorku těchto hodnot: metanolový extrakt drogy z oblasti Snina  $75,404 \%$ , metanolový extrakt drogy z oblasti Stropkov  $68,560 \%$ , vodný extrakt drogy z oblasti Snina  $61,318 \%$ , vodný extrakt drogy z oblasti Stropkov  $46,857 \%$ .

## 7 LITERATURA

1. Racek, J.: Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. Praha, Galen, 2003.
2. Silva, B. A., Ferreres, F., Malva, J. O. et al.: Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chem.*, 2005; 90, 157-167.
3. Benedí, J., Arroyo, R., Romeco, C. et al.: Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide – induced oxidative damage in PC 12 cells. *Life Sci.*, 2004; 75, 1263 –1276.
4. Štípek, S. a kol.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Praha, Grada, 2000.
5. Hubík, J., Dušek, J., Spilková, J. a kol.: Obecná farmakognosie II. Sekundární látky. Praha, SPN, 1989.
6. Agostinisa, P., Vantighema, A., Merlevedea, W. et al.: Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int. J. Bioch. Cell Biol.*, 2002; 34, 221 – 241.
7. Baloun, J., Beneš, K., Minařík, J.: Farmaceutická botanika. Praha, Avicenum, 1978.
8. WHO monographs on selected medicinal plants. 2. ed. Geneva, World Health Organization, 2002.
9. Rezvania, A. H., Overstreetb, D. H., Perfumic, M. et al.: Plant derivatives in the treatment of alcohol dependency. *Pharmacol. Biochem. Be.*, 2003; 75, 593 – 606.
10. Tomko, J. a kol.: Farmakognozia učebnica pre farmaceutické fakulty. 2. vyd. Martin, Osveta, 1999.
11. Cakir, A., Mavi, A., Yildirim, A. et al.: Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity – guided fractionation. *J. Ethnopharmacol.*, 2003; 87, 73 – 83.
12. Butterweck, V., Böckersb, T., Korte, B. et al.: Long – term effects of St. John's wort and hypericin on monoamine levels in rat hypothalamus and hippocampus. *Brain Res.*, 2002; 930, 21 – 29.
13. Panocka, I., Perfumi, M., Angeletti, S. et al.: Effects of *Hypericum perforatum* extract on ethanol intake, and on behavioral despair. *Pharmacol. Biochem. Be.*, 2000; 66, 105 – 111.

14. Khalifa, A. E.: *Hypericum perforatum* as a nootropic drug: enhancement of retrieval memory of a passive avoidance conditioning paradigm in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 2001; 76, 49 - 57.
15. El-Sherbinya, D. A., Khalifaa, A. E., Attiab, A. S. et al.: *Hypericum perforatum* extrakt demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of skopolamine. *Pharmacol. Biochem. Be.*, 2003; 76, 525 - 533.
16. Luo, L., Sun, Q., Mao, Y. Y. et al.: Inhibitory effects of flavonoids from *Hypericum perforatum* on nitric oxide synthase. *J. Ethnopharmacol.*, 2004; 93, 221 - 225.
17. Menegazzia, M., Paolab, R. D., Mazzonb, E. et al.: *Hypericum perforatum* attenuates the development of carrageenan – induced lung injury in mice. *Free Rad. Biol. Med.*, 2005; v tisku.
18. Kergeta, M., Kotnika, P., Hadolinb, M. et al.: Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.*, 2005; 89, 191 - 198.
19. www: Mikro-verze AISLP-ČR.
20. Masuda, T., Inaba, Y., Maekawa, T. et al.: Simple detection method of powerful antiradical compounds in the raw extract of plants and its application for the identification of antiradical plant constituents. *J. Agric. Food Chem.*, 2003; 51, 1831 – 1838.
21. Český lékopis 2002. Praha, Grada, 2002.
22. Hostenska, K., Reichlingb, J., Bommerc, S.: Hyperforin a constituent of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induced apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity toward human malignant cell lines. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2003; 56, 121 – 132.
23. Peeblesa, K. A., Bakerb, R. K., Kurza, E. U. et al.: Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase II; by hypericin, a naphthodiantrone from St. John's wort (*Hypericum perforatum* ). *Biochem. Pharmacol.*, 2001; 62, 1059 – 1070.
24. Hunt, E. J., Lester, C. E., Lester, E. A. et al.: Effect of St. John's wort on free radical production. *Life Sci.*, 2001; 69, 181 – 190.
25. Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T. et al.: Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 2005; 96, 145 – 150.

26. Aaby, K., Hvattum, E., Skrede, G.: Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high – performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2004; 52, 4595 – 4603.
27. Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V.: Free radical scavenging and antioxidant activity of 5, 7, 3; 4, 2; - hydroxy – substituted flavonoids. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2004; 5, 523 – 528.
28. Zou, Y., Lu, Y., Wei, B.: Antioxidant activity of a flavonoid – rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 2004; 52, 5032 – 5039.
29. Wach, A., Pyrzyńska, K., Biesaga, M.: Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chem.*, 2005; v tisku.
30. Choi, Ch. W., Kim, S. C., Hwang, S. S. et al.: Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay – guided comparison. *Plant Sci.*, 2002; 163, 1161 – 1168.
31. Janga, M. H., Leea, T. H., Shina, M. Ch. et al.: Protective effect of *Hypericum perforatum* Linn (St. John’s wort) against hydrogen peroxide – induced apoptosis on human neuroblastoma cells. *Neurosci. Lett.*, 2002; 329, 177 – 180.
32. Abreu I. N., Porto A. L. M., Marsaioli A. et al.: Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. *Plant Sci.*, 2004; 167, 949 – 954.