

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmakognozie

ANTIRADIKÁLOVÁ AKTIVITA PŘÍRODNÍCH
LÁTEK III.
(diplomová práce)

Vypracovala : Jana Štindlová

Vedoucí práce : doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.

Oponent : doc. RNDr. Jaroslav Dušek, CSc.

Zadáno dne : 29.10.2004

Odevzdáno dne : 15.5.2006

Datum obhajoby : 6.6. 2006

Děkuji doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. za odborné vedení a pomoc při zpracování diplomové práce a také Mgr. Vendule Vrchovské a Boženě Stružkové za pomoc a rady při experimentální práci.

Prohlašuji, že jsem na této diplomové práci pracovala samostatně a použila jsem pouze uvedenou literaturu.

V Brně dne 15. května 2006

Jana Štindlová
.....

Jana Štindlová

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. CÍL PRÁCE	7
3. TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1. Botanický popis	8
3.2. Obsahové látky	8
3.3. Účinky a použití	9
3.4. Interakce	13
3.5. Nežádoucí účinky	14
3.6. Antioxidační aktivita	15
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
4.1. Materiál	19
4.2. Přístroje	19
4.3. Chemikálie	19
4.4. Stanovení obsahu flavonoidů	20
4.5. Stanovení obsahu hypericinů	21
4.6. Ztráta sušením	22
4.7. Stanovení zbytku po vysušení extraktu	22
4.8. Stanovení antiradikálové aktivity	22
4.8.1. Vodný extrakt	22
4.8.2. Methanolový extrakt	23
4.8.3. Stanovení antiradikálové aktivity hypericinů po semipreparativní izolaci	23
5. VÝSLEDKY	25
5.1. Tabulky	25
5.2. Grafy	41
6. DISKUZE	44
7. ZÁVĚR	45
8. LITERATURA	46

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA.....antioxidační aktivita

DPPH.....2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

NOS.....syntáza oxidu dusnatého

RNS.....reaktivní formy dusíku

ROS.....reaktivní formy kyslíku

VR.....volné radikály

1. ÚVOD

Antioxidační aktivita je schopnost látek odstraňovat volné radikály a vysoce reaktivní sloučeniny kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) a působit tak proti oxidačnímu stresu.

Kyslíkové radikály jsou aktivní formy kyslíku, velmi reaktivní sloučeniny, které za určitých okolností vznikají v organismu – v místech intenzivního aerobního metabolismu, při zánětu, vlivem záření. Mají velmi krátký poločas. Patří k nim např. superoxidový a hydroxylový radikál, singletový kyslík a peroxid vodíku, z něhož mohou kyslíkové radikály vznikat. V organismu plní různé funkce – účastní se např. likvidace bakterií ve fagocytech nebo průniku spermií do vajíčka. Ale jejich nadměrný vznik a současný nedostatek přirozených ochranných mechanismů jsou jedním z faktorů, které organismus poškozují. Spouštějí řetězové reakce, kterými vznikají další volné radikály. Dochází hlavně k poškození proteinů, lipidů a nukleových kyselin.

Nadměrné množství volných radikálů v těle může vést ke vzniku nebo zhoršení mnoha nemocí jako jsou ateroskleróza, autoimunitní choroby, diabetes melitus, karcinogeneze, Alzheimerova a Parkinsonova choroba. Mají vztah i ke stárnutí.

V lidském těle je řada přirozených antioxidačních mechanismů, které jsou schopny zneškodnit radikály bez poškození okolních buněk. Mezi ně patří např. některé enzymy jako superoxidodismutáza, která přeměňuje superoxidový radikál na peroxid vodíku, nebo kataláza, která tento peroxid rozkládá.

Ochranný vliv mají i některé vitamíny, jako vitamin A, C, E, nebo beta-karoten, koenzym Q a stopové prvky selen, zinek, měď.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo stanovení antioxidační aktivity u oficiální drogy *Herba hyperici* a hlavní obsahové látky hypericinu. Tato droga je široce využívána v lidovém léčitelství a v oficiální terapii hlavně jako antidepresivum. Byly prokázány i její antioxidační vlastnosti, ale i závažné interakce s běžně užívanými léčivy způsobené ovlivněním enzymové aktivity hlavně cytochromu P450.

Stanovení bylo provedeno spektrofotometricky, měřením schopnosti extraktů *Hypericum perforatum* odstraňovat radikály DPPH.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. BOTANICKÝ POPIS

Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum* L.) je vytrvalá bylina z čeledi *Hypericaceae*. Je 30 – 60cm vysoká. Z větveného plazivého oddenku vyrůstají četné přímé a tuhé lodyhy, které jsou na průřezu oblé a mají pouze dvě podélné úzké lišty. (1) Listy jsou vstřícné, přisedlé, vejčité až čárkovité, celokrajné, s četnými průsvitnými tečkami (2), které jsou tvořené siličnými nádržkami, a roztroušenými černými tečkami, které obsahují červený hypericin. Pětičetné pravidelné žluté květy jsou v okolíčnatých květenstvích. (1) Plod je vejcovitá mnohosemenná 6 – 10mm dlouhá tobolka.(2)

Třezalka roste na sušších loukách, skalnatých stepních stráních a ve světlých lesích a křovinách. Rozšířena je v Evropě, západní Asii a severní Africe. Kvete od června do září.(2)

Drogu tvoří usušená kvetoucí nať, která se sbírá od června do srpna.(1)

3.2. OBSAHOVÉ LÁTKY

Třezalka obsahuje několik skupin látek. Mezi tři hlavní farmakologicky aktivní složky patří 0,05-0,15% antraglykosidů (hypericin, pseudohypericin, cyklopseudohypericin, isohypericin, protohypericin), 2-5% flavonoidů (kvercetin, izokvercetin, rutin, hyperosid, isokvercitrin, kvercitrin, biapigenin, kempferol, avikularin, luteolin) a floriglucinolové deriváty (hyperforin a adhyperforin). Dále obsahuje méně významné látky jako 0,05-1% silice (monoterpeny – α -pinen, β -pinen, limonen a seskviterpeny – karyofylen, humulen), 6,5-15% tríslovin katechinového typu (katechin, epikatechin, leokocyanidin), kumaríny (umbeliferon, skopoletin), steroly (β -sitosterol), cholin, organické kyseliny (kys. nikotinová, kys. kávová, kys. chlorogenová, kys. askorbová), xantonové deriváty, karotenoidy a další.(17, 27) Hlavní sloučeniny byly potvrzeny pomocí LC-MS.(14)

Flavonoidy, zvláště kvercetin a jeho glykosidy, jsou hlavní látky přítomné v celkovém ethanolovém extraktu třezalky, představují téměř 57% z celkového množství přítomných fenolických sloučenin.(17)

Odlišnosti v obsahu látek mezi jednotlivými vzorky rostoucími v různých oblastech jsou způsobeny faktory životního prostředí jako chemicko-fyzikální vlastnosti, složení půdy, geografické souřadnice, nadmořská výška a doba slunečního svitu.(12)

3.3. ÚČINKY A POUŽITÍ

Už staří Řekové a Římané znali léčivé použití třezalky a přisuzovali jí magický význam.(4)

Název „Hypericum“ pochází z řečtiny a znamená „nad obraz“, což může poukazovat na skutečnost, že již v antice zavěšovali třezalku nad obrazy bohů, aby tak odpudila zlé duchy. První zmínky o používání v západoevropském léčení pochází z dob středověku. Zmiňuje se o ní i Paracelsus, který poukázal na její léčivé účinky na psychiku. Využívala se k léčení popálenin a ran, při průjmech, bolestech břicha, otravách a psychických potížích.(26)

Látky obsažené v třezalce, které jsou především odpovědné za antidepresivní působení, jsou hypericin a hyperforin. Způsobují vzrůst hladiny serotoninu, který má ochranný efekt proti oxidativnímu poškození nervových buněk. (3) Některé studie uvádějí, že třezalka účinkuje pomocí inhibice zpětného vychytávání také dopaminu a noradrenalinu spolu s aktivací γ -aminobutyrateových a glutamátových receptorů. Ve vysokých dávkách je hypericin inhibitor monoaminoxidázy.(4) Také tato inhibice má neuroprotektivní působení, protože existuje souvislost mezi zvýšenou oxidací monoaminů a nadprodukcí volných kyslíkových radikálů.(3)

Na antidepresivním účinku se podílejí i jiné složky extraktu. Mechanismus jejich účinku zatím není zcela objasněn. Mimo to některé z nich zvyšují expresi P-glykoproteinového přenašeče nebo expresi enzymů cytochromu P450, což možná přispívá k interakcím s běžnými léky.(10)

Protože hypericin a hyperforin jsou prozkoumány nejvíce, většina přípravků obsahujících třezalku je standardizována na jejich obsah.(4)

Také značně inhibuje aktivitu xantinoxidázy, což naznačuje, že kromě přímého odstranění radikálů, může i inhibice tohoto enzymu přispět k odstraňování O_2^- iontů. Extrakt má schopnost zhaset radikály jak s centrálním dusíkovým atomem tak i s centrálním kyslíkovým atomem. Jako donor elektronů může reagovat s volnými radikály a přeměnit je na stabilnější látky a ukončit tak řetězovou radikálovou reakci.(3)

Třezalka je v léčbě mírné až střední deprese efektivnější než placebo nebo stejně efektivní jako tradiční starší antidepresiva jako např. amitriptylin, fluoxetin, imipramin, sertralin.(4) a využívá se k tomuto účelu. Je ale neúčinná na léčbu průměrně vážné těžké deprese.(14)

Užívání třezalkového extraktu má klinicky významný efekt na pacienty s mírnou depresí, ale už ne tak výrazný při dysthímii.(23)

Ve srovnání se selektivními inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a tricyklickými a tetracyklickými antidepresivy, pacienti uváděli méně častěji nežádoucí účinky.(20)

Oxidační stres v mozku může vést ke vzniku demence. Nízké dávky třezalky vykazující antioxidační aktivitu mohou být užitečné pro pacienty trpící demencí, u nichž byla zjištěna v mozku zvýšená oxidace. Protože se běžně současně s demencí vyskytují i deprese, je třezalka pro tyto pacienty lepší alternativou než některá další antidepresiva.(3, 9)

Ke zmírnění příznaků deprese je dostačující dávka 900mg pevného extraktu třezalky denně, rozdělena do 2 nebo 3 dílčích dávek. Plný účinek se objeví až za 2-4 týdny užívání.(4)

Po orálním podání extraktu byly plazmatické hladiny měřitelné během 2-3 hodin. Strmý kumulativní vzestup plazmatických hladin byl pozorován během prvních tří dnů, ale další vzestup pokračoval několik týdnů. Eliminační poločas byl 24-48 hodin.(4) Biologická dostupnost je nízká, ustálený stav plazmatické koncentrace je variabilní a jeho předpověď je komplikovaná, což je způsobeno nelineární farmakokinetikou hypericininu a hyperforinu. Tyto látky také dosahují CNS v nezanedbatelných koncentracích, což prokázaly studie tkáňové distribuce u zvířat. Clearance je spíše nižší, exkrece nezměněných nebo jen málo změněných látek probíhá močí.(10)

Třezalka se používá i k léčení dalších obtíží jako je zmírnění premenstruačního syndromu a obscesivně-kompulsivní poruchy.(4)

Byly také zkoumány protikřečové vlastnosti extraktu. Vodný i ethanolový extrakt podaný myším prokázal zmírnění křečí, což naznačuje možnost přispění ke kontrole epileptického záchvatu petit mal. Tento účinek je částečně zprostředkován oxidem dusnatým.(7)

Jako vedlejší efekt užívání přípravků z třezalky byla pozorována sexuální dysfunkce, která má vztah ke kontraktilitě hladké svaloviny vas deferens. Pokusem bylo potvrzeno, že třezalka i její složka hyperforin přímo inhibují fenylefrinem navozenou kontrakci lidské vas deferens.(8)

Třezalka má antibakteriální účinky hlavně na G+ bakterie a také antifungální účinky na rostlinné patogeny.(12)

Podání středních a vyšších dávek extraktu třezalky významně snižuje v krvi hladinu lipidů jako je celkový cholesterol, celkové triglyceridy a LDL cholesterol, a zároveň zvyšuje sérové hladiny HDL cholesterolu. Na hypocholesterolemických účincích se také podílí schopnost zpomalit peroxidaci lipidů a zvýšení aktivity antioxidantních enzymů.(13)

Stanovením obsahu kvercetinu a jeho metabolitů tamarixetinu a isorhamnetinu ve velmi nízkých koncentracích v krysím mozku při prozkoumání schopnosti flavonoidů překročit bariéru mezi krví a mozem, byla v mozku nalezena jejich přítomnost po podání extraktu, což dokazuje schopnost těchto látek překročit tuto bariéru.(15)

Hyperforin inhibuje proliferaci nádorových buněk in vitro indukcí apoptózy. Také působí jako inhibitor angiogeneze in vitro i in vivo. In vitro blokuje vznik mikrocév z lidských kožních mikrovaskulárních endoteliálních buněk na komplexní extracelulární matrix. Ovlivnění proliferace těchto buněk je závislé na dávce, bez toxických účinků a vyvolání apoptózy buněk. Při podání extraktu třezalky do okolí nádoru vykazoval výraznou inhibici jeho růstu, indukci apoptózy nádorových buněk a redukci

vaskularizace nádoru. Hyperforin tak může potlačit angiogenezi přímým, netoxickým působením na endoteliální buňky.(16)

Zevně se využívá jako mast nebo olejový extrakt k léčení drobných poranění kůže, pohmožděnin, ekzémů, otoků, popálenin a kožních ulcerací.(17)

Třezalka vykazuje účinky proti bolesti i otokům, čehož lze využít při léčení bolestivých zánětů. Také ale způsobuje podráždění žaludku a může zhoršit působení nesteroidních protizánětlivých látek na GIT.(18)

Také byly zkoumány účinky na příjem alkoholu. CO₂ extrakt byl podán přímo do žaludku krys závislých na ethanolu. Bylo pozorováno výrazné snížení dobrovolného příjmu ethanolu, také vymizel jeho zvýšený příjem po předchozím nedostatku. Tyto poznatky by bylo možné použít při léčbě alkoholismu.(19)

Hypericin má antidepresivní, protinádorové a protivirové účinky. Mechanismus účinku ale není zcela objasněn. Inhibuje řadu významných enzymů jako monoaminoxidázu, protein kinázu C, dopamin- β -hydroxylázu, reverzní transkriptázu, telomerázu a CYP. Také ovlivňuje GABA-aktivované receptory a NMDA-receptory. V současné době je intenzivně zkoumán jako možný nový terapeutický a diagnostický činitel v léčbě a detekci rakoviny pomocí fotodynamické aktivace produkce volných radikálů.(22)

Oxid dusnatý (NO) zprostředkováváající inter- i intracelulární signalizaci, hraje důležitou roli v různých fyziologických procesech a patofyziologických stavech. Vzniká oxidací koncové guanidinové skupiny L-argininu působením syntázy oxidu dusnatého (NOS). NOS je metaloenzym obsahující hem.

Existují tři odlišné izoformy savčí NOS – endoteliální, neuronální a indukovatelná.

NO působí v těle jako biologický posel. Reaguje s peroxidovým radikálem za produkce reaktivnějších oxidantů jako je peroxylnitrát, což vede k poškození buněk. Nadprodukce NO vede k endotoxickému šoku, diabetu, odhojování transplantátu, mozkové ischemii a některým degenerativním poruchám jako je Alzheimerova choroba a deprese. Reakce NO a peroxidu může poskytnout různé vysoce toxické látky jako

ONOO⁻, které hrají důležitou roli v poškození a zničení buněk. V CNS způsobuje excitotoxicitu a opakované používání inhibitorů NOS vykazuje ochranný charakter.

Byla stanovena inhibice NOS působením kvercetinu, kvercitrinu, hyperosidu, avikularinu, kempferolu a rutinu. Nejaktivnějšími složkami byly kvercetin a hyperosid. Na druhou stranu, kvercitrin a rutin nevykazovaly žádný efekt.

Kvercetin a hyperosid kompetitivně inhibují schopnost NOS v krevní krvi katalyzovat oxidaci koncové guanidinové skupiny L-argininu a tím produkci NO. Tento účinek je na dávce závislý. Inhibují NOS také v mozku, ale jsou mezi nimi rozdíly. Zatímco hyperosid inhibuje NOS zcela, kvercetin zanechá 35% enzymu aktivním. Z toho vyplývá, že kvercetin je neselektivní inhibitor NOS, zatímco hyperosid je více selektivnější pro neuronální NOS. Z toho lze předpokládat, že přítomnost galaktózy v hyperosidu je spojena se selektivitou inhibice. Je zde také vztah mezi inhibicí NOS a antidepressivním působením flavonoidů.(24)

3.4. INTERAKCE

Třezalka aktivuje jaderný receptor zvaný pregnanový-X-receptor, který jako ligandem aktivovaný transkripční faktor indukuje množství enzymů podílejících se na metabolismu xenobiotik a transportéry zahrnující cytochrom P450 izoenzym 3A4. Protože CYP3A4 sám metabolizuje okolo 60% klinicky užívaných léčiv, jeho indukce může urychlit eliminaci těchto léčiv a tím snížit jejich účinnost. Tyto účinky ale nejsou okamžité.(6)

Také má za následek lékové interakce se substráty několika izoenzymů cytochromu P450. Působení na aktivitu CYP způsobuje značný pokles biologické dostupnosti dextrometorfanu a midazolamu, což jsou substráty CYP2D2 resp. CYP3A2 a zvýšení biologické dostupnosti tolbutamidu jako substrátu CYP2C6. Výsledkem podání třezalky je tedy indukce CYP2D2 a CYP3A2 a inhibice CYP2C6.(11)

Zkracuje také biologický poločas estrogenů, což je významné pro ženy užívající hormonální antikoncepci.(4)

Bylo prokázáno, že třezalka indukcí CYP3A4 působí vzestup clearance četných léčiv a steroidů jako kortizol a ethinylestradiol. Zdravým dobrovolníkům byl po dobu 14 dnů

podáván třezalkový extrakt a imunologicky byla měřena hladina hormonů. Hladina většiny sledovaných androgenů se nijak výrazně nezměnila. Koncentrace 5- α -redukovaných steroidů androsteron sulfátu a epiandrosteron sulfátu výrazně poklesla, poměr obsahu testosteronu a dihydrotestosteronu vzrostl. Tyto výsledky se shodují s možností inhibice 5- α -reduktázy. I přes výraznou indukci CYP3A4, krátkodobé podávání třezalky nezmění výrazně koncentraci většiny cirkulujících androgenů u mužů i u žen, ale může snížit množství cirkulujících 5- α -redukovaných androgenů.(21)

Vzhledem k možnosti rozvinutí serotoninového syndromu, se nedoporučuje společně užívání se selektivními inhibitory zpětného vychytávání serotoninu. Dále musí být užívána s opatrností u pacientů s bipolární poruchou kvůli možnosti vyvolání mánie.(4)

Užívání přípravků z třezalky neovlivňuje schopnost reagovat a nezpůsobuje ospalost, což umožňuje vykonávat činnosti vyžadující pozornost. Naopak zvyšuje schopnost soustředění a podporuje aktivitu. Alkohol a jiné tlumivé látky nemají na účinky třezalky vliv. (26)

Třezalka je kontraindikována v těhotenství a při kojení. (26)

3.5. NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY

Při srovnání s ostatními antidepresivy nebyly pozorovány žádné závažné nežádoucí účinky. Objevily se jen mírné nežádoucí účinky jako gastrointestinální obtíže, vzrůst úzkosti, palpitace, fotosenzitivita, únava, nespavost, sucho v ústech, bolest hlavy a vzrůst deprese. Nejvíce se vyskytujícím nežádoucím účinkem je přechodná fotosenzitivita, která se vyskytuje více při užívání vyšších dávek. Proto by lidé užívající třezalku neměli příliš dlouho pobývat na přímém slunci.(4)

3.6. ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

Volné radikály, které mají jeden nebo více nepárových elektronů ve vnějším orbitalu nebo látky, které tato radikály poskytují, mohou mít jako centrální atom kyslík a jsou známé jako reaktivní formy kyslíku (ROS) jako např. superoxid O_2^- , hydroxylový radikál $OH\cdot$, peroxy $ROO\cdot$, kyselina chlorná $HOCl$, peroxid vodíku H_2O_2 a ozón O_3 , nebo mají jako centrální atom dusík a nazývají se reaktivní formy dusíku (RNS) jako např. oxid dusnatý $NO\cdot$, nitrosyl NO^+ , oxid dusičitý NO_2 , kyselina dusitá HNO_2 a peroxyinitrit $ONOO$. (14, 25) Poločas jejich existence bývá krátký, proto je obtížné stanovit jejich hladinu v lidském těle. (25)

Porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním ROS a RNS se nazývá oxidační stres. Může být vyvolán jejich nadměrnou produkcí, nedostatečnou funkčností antioxidačního ochranného systému nebo kombinací obou těchto nedostatků. Ale také naopak, dlouho trvající a intenzivní oxidační zatížení může vyčerpat nebo oslabit tento systém.

Ochrana organismu proti oxidačnímu stresu je systém, ve kterém antioxidanty a celá jejich seskupení vzájemně spolupracují. Funkce jednoho antioxidantu velmi často podmiňuje účinek jiného článku soustavy. (25)

Ve snaze o prevenci nebo zmenšení poškození způsobených VR je nutná prevence jejich vzniku. Podle současných studií tuto antioxidační aktivitu vykazuje množství rostlinných produktů obsahujících polyfenoly, flavonoidy a terpeny. (3)

Volné radikály vznikající mnoha redoxními procesy jsou zcela obecným metabolitem v každé buňce, proto musí být každá vybavena prostředky, které ji před těmito vysoce reaktivními látkami chrání. VR se účastní uvolňování a přeměny energie nezbytné pro životní pochody, jsou součástí enzymových mechanismů a některé z nich jsou významnými signálními molekulami v buněčném informačním systému. Neutrofilní leukocyty a makrofágy používají ROS k odstraňování zbytků mrtvých buněk a k zabíjení bakterií. (17, 25)

Reaktivní sloučeniny mohou atakovat většinu biomolekul. Způsobují tak peroxidaci lipidů, poškození proteinů oxidací aminokyselin, čímž dojde ke ztrátě enzymové, signální nebo transportní funkce, a poškození DNA.(25)

Volné radikály se uplatňují i v patologických procesech. Podílejí se na zánětu, nekróze, apoptóze, reperfučním poškození tkáně, stárnutí a dalších. (25)

Jejich přebytek může vyústit v rozvoj chronických onemocnění jako je rakovina, ateroskleróza a revmatismus. Oxidační stres také hraje důležitou roli v rozvoji neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba.(17)

Buňky mají několik obranných mechanismů zahrnující antioxidantní enzymy a neenzymatické sloučeniny. Tyto endogenní systémy jsou v normálním stavu vždy dostatečné pro kompletní odstranění VR. (17)

Problémem antioxidantní terapie je v tom, že oxidační stres se vyskytuje téměř u všech nemocí a často bývá pouze průvodním jevem. Je tedy nutné podávat vyvážené antioxidanty s různými mechanismy účinku, aby mohly proniknout do patřičných kompartmentů.(25)

Mnoho látek rostlinného původu má antioxidantní vlastnosti, z nichž nejznámější jsou účinky flavonoidů. Tyto látky vyskytující se v ovoci, čaji, zelenině a léčivých rostlinách mají aromatický charakter odvozený od 2-fenylchromonu. Jsou schopné vázat přechodné kovy, indukovat a ovlivňovat některé enzymy (aryl- a epoxid- hydroxylázy, proteinkinázu C), inhibovat xantinoxidázu, lipoxygenázu a lipoperoxidaci. Vysoký obsah je v červeném víně, zeleném a černém čaji.(17, 25)

V situacích zvýšeného vzniku volných radikálů může být zesílen účinek endogenních antioxidantů přijímáním antioxidantů potravou, což je částečně důležité pro zeslabení kumulativních efektů oxidačně poničených molekul.(17) Přírodní antioxidanty, jako flavonoidy, jsou považovány za méně toxické než syntetické.(14)

Kromě hypericinu a hyperforinu obsahuje extrakt třezalky různé aktivní složky jako fenolické sloučeniny se schopností zhaset VR. Volné OH skupiny v těchto sloučeninách jsou hlavní příčinou jejich antioxidantní aktivity. Z toho může vyplývat, že antioxidantní a neuroprotektivní účinky extraktů jsou způsobeny spíše obsahem flavonoidů než

hypericin a hyperforin a to i přesto, že hypericin obsahuje 6 OH skupin, což je více než některé další rostlinné polyfenoly.(3)

Kvercetin, který má 5 OH skupin, je neefektivnější antioxidant v odstraňování DPPH. Přítomnost zbytků cukru jako u rutinu a hyperosidu, má za následek pokles AA.

Součástí extraktu obsahující flavonoidy a/nebo kafeoylchinové kyseliny přispívají nejvíce k AA celého extraktu, také redukují peroxidaci lipidů. Frakce obsahující aglykony flavonoidů jsou považovány za hlavní část extraktu odpovědnou za ochranu proti peroxidaci lipidů. Hypericiny a hyperforiny nepřispívají výrazně k antioxidačním vlastnostem třezalky.

Vyšší účinnost flavonoidních aglykonů v lipidových systémech, na rozdíl od jejich glykosidů, je způsobena hlavně jejich nižší polaritou a vyšším rozdělovacím koeficientem.(17)

Pozorované antioxidační vlastnosti celkového ethanolového extraktu třezalky mohou být částečně zodpovědné za účinky této rostliny, hlavně v případech spojených se vznikem volných radikálů, jako jsou protizánětlivé vlastnosti. ROS byly prokázány jako příčina destrukce CNS, proto antioxidační vlastnosti produktů které projevují své účinky v CNS jako extrakty třezalky, mohou být prospěšné v situacích oxidačního stresu na této úrovni. Bariéru mezi krví a mozkem jsou schopné překonat flavonoidy a jejich metabolity. Je tedy možné předpokládat, že používání extraktu třezalky se může projevit pozitivním působením v CNS.(17)

Stanovení antioxidační aktivity je využitelné i při identifikaci obsahových látek v extraktech rostlinných drog. Pomocí rozdělovací chromatografie jsou extrakty nejprve tříděny podle svých antioxidačních složek pomocí techniky on-line zhášení radikálů DPPH nebo ABTS. Objasnění struktury je dále provedeno pomocí LC-MS a LC-UV-NMR.(5)

Antioxidační aktivita celkového extraktu třezalky byla určena pomocí peroxidace kyseliny linolové použitím thiokyanátové metody při 37°C po přidání různých koncentrací extraktu. Během této reakce vznikají peroxidy, které následně oxidují Fe^{2+} na Fe^{3+} . Fe^{3+} tvoří komplexy s SCN^- , které mají maximum absorpce při 500nm. Vysoká absorpce je tak důkazem vysoké koncentrace peroxidů vznikajících během inkubace.

AA vykazuje na dávce závislé chování. Redukční síla extraktů byla nižší než kys. askorbové. IC_{50} celkového extraktu byla nižší než kvercetin a stejná jako hyperosidu, dvou základních složek extraktu. AA převyšovala α -tokoferol.(14)

Extrakt třezalky vykazuje při zhášení DPPH radikálů účinek závislý na dávce. (14)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. MATERIÁL

Nať třezalky tečkované *Hyperici herba* získané sběrem v Jablonci nad Nisou (označeno HJ) a v Zahradě léčivých rostlin farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové (označeno HH).

4.2. PŘÍSTROJE

- vodní lázeň (GFL, SRN)
- rotační vakuová odparka
- inkubační lázeň (HEIDOLPH, SRN)
- ultrazvuková lázeň (SONOREX RX 100H, SRN)
- odstředivka
- sušárna
- analytické váhy (KERN & SOHN GmbH, SRN)
- laboratorní váhy (KERN & SOHN GmbH, SRN)
- spektrofotometr UV 1601 (SHIMADZU, Austrálie)
- chromatografické desky SILUFOL (KAVALIER, Votice, ČR)
- UV lampa (KRÜSS Optronics, SRN)
- mlýnek (MOULINEX)

4.3. CHEMIKÁLIE

- methanol R
- kyselina mravenčí bezvodá R
- ethylacetát R
- čištěná voda R
- roztok DPPH

- ethanol 60% R
- kyselina octová ledová R
- kyselina boritá R
- kyselina šťavelová R
- tetrahydrofuran R
- hyperosid R
- kyselina chlorogenová R
- rutin R

4.4. STANOVENÍ OBSAHU FLAVONOIDŮ

Postup (dle ČL 2002 článku Crataegi folium cum flore)

Příprava extraktu:

0,400g drogy (250) a 40ml ethanolu 60% jsem zahřívala 10 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem při 60°C a pak přefiltrovala přes vatou do 100ml odměrné baňky. Ke zbytku drogy jsem přidala opět 40 ml ethanolu a zahřívala 10 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem při 60°C. Roztok jsem přefiltrovala do stejné odměrné baňky, filtr promyla ethanolem a objem doplnila ethanolem na 100ml.

Vlastní stanovení:

Zkoušený roztok : 5,0ml extraktu jsem odpařila dosucha za sníženého tlaku. Odparek jsem rozpustila v 8ml směsi objemových dílů methanolu R a kys. octové ledové R (10 + 100) a převedla do 25ml odměrné baňky. Varnou baňku jsem ještě propláchla 3ml směsí, které jsem přidala do odměrné baňky. Dál jsem přidala 10ml roztoku kys. borité R (25,0g/l) a kys. šťavelové R (20,0g/l) v kys. mravenčí bezvodé R a zředila kys. octovou bezvodou na 25ml.

Kontrolní roztok : 5,0ml extraktu jsem odpařila dosucha za sníženého tlaku. Odparek jsem rozpustila v 8ml směsi objemových dílů methanolu R a kys. octové ledové R (10 + 100) a převedla do 25ml odměrné baňky. Varnou baňku jsem ještě propláchla 3ml směsí, které jsem přidala do odměrné baňky. Dál jsem přidala 10ml kys. mravenčí bezvodé R a zředila kys. octovou bezvodou na 25ml.

Po 30 minutách jsem změřila absorbanci zkoušeného roztoku proti kontrolnímu roztoku při 410 nm.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid:

$$\% = \frac{A \cdot 1,235}{m}$$

A.....absorbance při 410nm

m.....hmotnost zkoušené drogy v gramech

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č.1.

4.5. STANOVENÍ OBSAHU HYPERICINŮ

Postup (dle ČL 2002 článku Hyperici herba)

0,800g drogy (500) jsem smíchala se 60ml směsi objemových dílů vody R a tetrahydrofuranu R (20+80) a vařila 30 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem při 70°C. Roztok jsem odstředila 2 minuty při 3500 otáčkách a tekutinu převedla do 250ml baňky. Ke zbytku drogy jsem opět přidala 60ml směsi a vařila 30 minut pod zpětným chladičem při 70°C na vodní lázni a pak odstředila. Odstředěnou tekutinu jsem přidala do 250ml baňky a spojené roztoky odpařila do sucha za sníženého tlaku. Odparek jsem rozpustila v methanolu a převedla do 25ml odměrné baňky a objem doplnila methanolem. Roztok jsem odstředila a 10ml přefiltrovala přes fritu. První 2ml filtrátu jsem odstranila. Ze zbylého filtrátu jsem odebrala 5ml, převedla do odměrné 25ml baňky a objem doplnila methanolem.

Pak jsem změřila absorbanci tohoto roztoku při 590nm proti methanolu.

Obsah hypericinu v %, vyjádřeno jako hypericin :

$$\% = \frac{A \cdot 125}{m \cdot 870}$$

A.....naměřená absorbance

m.....navážka drogy v gramech

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 2

4.6. ZTRÁTA SUŠENÍM

Postup (podle ČL 2002):

0,600g drogy (500) jsem sušila 2h v sušárně v předem vysušené a zvážené váženke při 100–105°C. Po vychladnutí jsem ji opět zvážila. Rozdíl těchto hodnot odpovídá ztrátě sušením.

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č.3 a č.4.

4.7. STANOVENÍ ZBYTKU PO VYSUŠENÍ EXTRAKTU

Postup (podle ČL 2002)

Methanolvý extrakt

0,5000 g drogy v 50 ml methanolu jsem zahřívala na vodní lázni pod zpětným chladičem při 65°C po dobu 30 minut. Extrakt jsem zfiltrovala do 50,0 ml odměrné baňky a objem doplnila methanolem. Odebrala jsem 2 ml, které jsem dala do předem vysušené a zvážené váženky a na vodní lázni odpařila do sucha. Váženku jsem pak dala na 3 hodiny do sušárny a po vychladnutí jsem ji zvážila. Stanovení jsem provedla s každým vzorkem dvakrát.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Vodný extrakt:

Stejný postup jako u methanolového extraktu, místo methanolu jsem použila čistou vodu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 6.

4.8. STANOVENÍ ANTIRADIKÁLOVÉ AKTIVITY

4.8.1. Vodný extrakt

Příprava vodného extraktu :

K 0,5g drogy jsem přidala 50ml čisté vody a zahřívala pod zpětným chladičem na vodní lázni při 65°C. Extrakt jsem zfiltrovala a objem doplnila na 50,0ml čistou

vodou. Z toho jsem odebrala 5,0ml a na rotační vakuové odparce odpařila dosucha. Odparek jsem rozpustila v methanolu na ultrazvukové lázni a objem doplnila na 25,0ml. Z toho jsem odebrala 1,25ml, dala do 25,0ml odměrné baňky a doplnila objem methanolem. Tímto ředěním jsem připravila 100x zředěný původní extrakt.

Vlastní stanovení antiradikálové aktivity :

Ze zředěného vodného extraktu jsem odebírala různé objemy od 0,1ml do 1,0ml, aby po zředění vznikla řada koncentrací původního extraktu. Ke každé koncentraci jsem přidala 100 μ l 0,02% roztoku DPPH v methanolu a objem doplnila methanolem na 5 ml. Reakční směs jsem inkubovala 30 minut při 37°C a pak změřila absorbanci při 517nm proti methanolu. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č.7 až 14.

4.8.2. Methanolvý extrakt

Příprava methanolového extraktu :

K 0,5g drogy jsem přidala 50ml methanolu a zahřívala pod zpětným chladičem na vodní lázni při 65°C po dobu 30 minut. Extrakt jsem zfiltrovala a objem doplnila na 50,0ml methanolem. Z tohoto extraktu jsem odebrala 0,25ml do odměrné baňky a objem doplnila na 50,0ml methanolem.

Vlastní stanovení antiradikálové aktivity :

Ze zředěného methanolového extraktu jsem odebírala různé objemy od 0,3ml do 2,5ml do 5,0ml odměrných zkumavek, aby vznikla řada koncentrací původního extraktu. Do každé jsem přidala 100 μ l 0,02% roztoku DPPH v methanolu a objem doplnila methanolem. Reakční směs jsem inkubovala při 37°C po 30 minut a pak jsem změřila absorbanci při 517nm proti methanolu. Výsledky jsou v tabulkách č.15 až 22.

4.8.3. Stanovení antiradikálové aktivity hypericinu po semipreparativní izolaci

Izolace hypericinu byla provedena pomocí TLC.

Příprava methanolového extraktu : viz kapitola 4.8.2.

Příprava vodného extraktu : viz kapitola 4.8.1.

Postup :

Z každého extraktu jsem zhotovila 3 chromatogramy, na každou desku jsem nanášela do úzkého proužku 250 μ l methanolového, resp. 400 μ l vodného extraktu.

Mobilní fáze : kyselina mravenčí : voda : ethylacetát = 6 : 9 : 90

Stacionární fáze : silikagel

Po odvětrání rozpouštědel jsem vyškrábala skvrnu odpovídající hypericinu (viz obr. č. 1), eluovala ji 5 ml methanolu na ultrazvukové lázni 5 minut. Roztok jsem přefiltrovala přes fritu a objem doplnila methanolem na 5 ml. Z toho jsem odebrala 4 ml, přidala 100 μ l 1% roztoku DPPH, objem doplnila methanolem na 5 ml a inkubovala 30 minut při 37 $^{\circ}$ C. Absorbanci jsem měřila při 517 nm proti methanolu. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 23 až 26.

$$\Delta A = A_0 - A_{vz.} \qquad \% = \frac{\Delta A \cdot 100}{A_{DPPH}}$$

A_0absorbance rozpouštědel

$A_{vz.}$absorbance jednotlivých vzorků

5. VÝSLEDKY

5.1. Tabulky

Tab. č.1 Stanovení obsahu flavonoidů (přepočteno na vysušenou drogu)

vzorek	m [g]	A	obsah flavonoidů [%]	Průměrný obsah flavonoidů [%] ± směrodatná odchylka
HH1	0,4023	0,858	2,8577	2,8559 ± 0,0372
HH2	0,4032	0,873	2,9006	
HH3	0,4025	0,844	2,8095	
HJ1	0,4011	1,308	4,3565	4,4015 ± 0,0550
HJ2	0,4032	1,352	4,4789	
HJ3	0,4039	1,321	4,3691	

Tab. č.2 : Stanovení obsahu hypericinů (přepočteno na vysušenou drogu)

vzorek	m [g]	A	obsah hypericinů [%]	průměrný obsah hypericinů [%] ± směrodatná odchylka
HH1	0,8014	0,658	0,1280	0,1338 ± 0,0042
HH2	0,8046	0,699	0,1354	
HH3	0,8018	0,710	0,1380	
HJ1	0,8016	1,894	0,3672	0,3593 ± 0,0100
HJ2	0,8007	1,778	0,3451	
HJ3	0,8010	1,884	0,3655	

Tab. č.3 : Ztráta sušením – vzorek HH

navážka vzorku [g]	ztráta sušením [g]	ztráta sušením [%]	průměrná ztráta sušením [%] ± směrodatná odchylka
0,6015	0,0467	7,76	7,82 ± 0,1891
0,6000	0,0458	7,63	
0,6026	0,0487	8,08	

Tab. č.4 : Ztráta sušením – vzorek HJ

navážka vzorku [g]	ztráta sušením [g]	ztráta sušením [%]	průměrná ztráta sušením [%] ± směrodatná odchylka
0,5978	0,0450	7,53	7,55 ± 0,0262
0,5919	0,0446	7,54	
0,6085	0,0462	7,59	

Tab. č. 5 : Stanovení zbytku po vysušení methanolového extraktu

vzorek	navážka [g]	hmotnost odparku [g]	průměrná hmotnost odparku [g] ± směrodatná odchylka
HH1	0,5028	0,0059	0,0061 ± 0,0002
HH2		0,0063	
HJ1	0,5011	0,0042	0,0043 ± 0,0001
HJ2		0,0044	

a) vzorek HH : průměrná hmotnost odparku : 0,0061 g = 6,1 mg ve 2 ml extraktu

=> v 1 ml extraktu : 3,05 mg → 3,05 mg/ml = 3,05 g/l

b) vzorek HJ : průměrná hmotnost odparku : 0,0043g = 4,3 mg ve 2 ml extraktu

=> v 1 ml extraktu 2,15 mg → 2,15 mg/ml = 2,15 g/l

Tab. č. 6 : Stanovení zbytku po vysušení vodného extraktu

vzorek	navážka [g]	hmotnost odparku [g]	průměrná hmotnost odparku [g] ± směrodatná odchylka
HH1	0,5020	0,0068	0,00675 ± 0,0001
HH2		0,0067	
HJ1	0,5012	0,0055	0,00600 ± 0,005
HJ2		0,0065	

a) vzorek HH : průměrná hmotnost odparku : 0,00675g = 6,75 mg ve 2 ml

=> v 1 ml extraktu 3,375 mg → 3,375 mg/ml = 3,375 g/l

b) vzorek HJ : průměrná hmotnost odparku : 0,0060g = 6,0 mg ve 2 ml

=> v 1 ml extraktu : 3,0 mg → 3 mg/ml = 3 g/l

Tab. č. 7 : Stanovení antiradikálové aktivity vodného extraktu vzorku HH

Navážka 0,5023g

objem vzorku [ml]	Hmotnost odparku [μg]	A _{DPPH}	A	% DPPH	průměrné %
0,1	3,376	0,402	0,363	9,70	7,81
		0,396	0,371	6,31	
		0,417	0,386	7,43	
0,3	10,128	0,402	0,268	33,33	34,00
		0,396	0,277	30,05	
		0,417	0,256	38,61	
0,5	16,88	0,402	0,205	49,00	48,57
		0,396	0,202	48,99	
		0,417	0,218	47,72	
0,6	20,256	0,402	0,173	56,97	56,47
		0,396	0,172	56,57	
		0,417	0,184	55,88	
0,8	27,008	0,402	0,105	73,88	74,16
		0,396	0,100	74,75	
		0,417	0,109	73,86	
1,0	33,760	0,402	0,068	83,08	81,83
		0,396	0,070	82,32	
		0,417	0,083	80,10	

Tab. č. 8 : Stanovení antiradikálové aktivity vodného extraktu vzorku HH
navážka 0,5012g

objem vzorku [ml]	Hmotnost odparku [μg]	A_{DPPH}	A	% DPPH	průměrné %
0,1	3,370	0,422	0,386	8,53	10,30
		0,367	0,339	7,63	
		0,380	0,324	14,74	
0,3	10,110	0,422	0,313	25,83	30,45
		0,367	0,254	30,79	
		0,380	0,248	34,74	
0,5	16,850	0,422	0,204	51,66	50,58
		0,367	0,189	48,50	
		0,380	0,184	51,58	
0,6	20,220	0,422	0,166	60,66	59,38
		0,367	0,167	57,22	
		0,380	0,151	60,26	
0,8	26,960	0,422	0,126	70,14	70,75
		0,367	0,113	69,21	
		0,380	0,103	72,89	
1,0	33,700	0,422	0,087	79,38	83,03
		0,367	0,059	83,92	
		0,380	0,054	85,79	

Tab. č. 9 : Stanovení antiradikálové aktivity vodného extraktu vzorku HH
navážka 0,5015g

objem vzorku [ml]	Hmotnost odparku [μg]	A _{DPPH}	A	% DPPH	průměrné %
0,1	3,372	0,346	0,288	16,76	16,27
		0,346	0,291	15,90	
		0,347	0,291	16,14	
0,3	10,116	0,346	0,204	41,04	38,98
		0,346	0,203	41,33	
		0,347	0,227	34,58	
0,5	16,860	0,346	0,145	58,09	59,29
		0,346	0,132	61,85	
		0,347	0,146	57,92	
0,6	20,232	0,346	0,124	64,16	65,00
		0,347	0,123	64,55	
		0,347	0,117	66,28	
0,8	26,976	0,346	0,075	78,32	79,90
		0,347	0,067	80,69	
		0,347	0,067	80,69	
1,0	33,720	0,346	0,046	86,71	86,92
		0,347	0,044	87,32	
		0,347	0,046	86,74	

Tab. č. 10 : Průměrná hodnota antiradikálové aktivity vodného extraktu vzorku HH

Odparek [μg]	0,00	3,373	10,118	16,863	20,236	26,981	33,727
%	0,00	11,46	34,48	52,81	60,28	74,94	83,93

Tab. č. 11 : Stanovení antiradikálové aktivity vodného extraktu vzorku HJ

Navážka : 0,5012 g

objem vzorku [ml]	Hmotnost odparku [μg]	A _{DPPH}	A	% DPPH	průměrné %
0,1	3,000	0,324	0,285	16,18	17,21
		0,324	0,273	19,71	
		0,337	0,284	15,73	
0,3	9,000	0,324	0,204	40,00	41,29
		0,324	0,189	44,41	
		0,337	0,204	39,47	
0,5	15,000	0,324	0,141	58,53	58,82
		0,324	0,139	59,18	
		0,337	0,139	58,75	
0,6	18,000	0,324	0,085	75,00	71,19
		0,337	0,108	67,95	
		0,337	0,099	70,62	
0,8	24,000	0,324	0,050	85,29	85,01
		0,337	0,053	84,27	
		0,337	0,049	85,46	
1,0	30,000	0,324	0,037	89,12	88,76
		0,337	0,039	88,43	
		0,337	0,038	88,72	

Tab. č. 12 : Stanovení antiradikálové aktivity vodného extraktu vzorku HJ
 Navážka : 0,5005 g

objem vzorku [ml]	Hmotnost odparku [μg]	A _{DPPH}	A	% DPPH	průměrné %
0,1	2,996	0,306	0,276	9,80	10,81
		0,306	0,256	13,40	
		0,293	0,266	9,22	
0,3	8,988	0,306	0,180	41,18	38,42
		0,306	0,189	38,24	
		0,293	0,188	35,84	
0,5	14,980	0,306	0,132	56,86	55,34
		0,306	0,137	55,23	
		0,293	0,135	53,92	
0,6	17,976	0,306	0,086	71,90	67,77
		0,293	0,102	65,19	
		0,293	0,099	66,21	
0,8	23,968	0,306	0,052	83,01	83,64
		0,293	0,045	84,64	
		0,293	0,049	83,28	
1,0	29,960	0,306	0,034	88,89	88,10
		0,293	0,036	87,71	
		0,293	0,036	87,71	

Tab. č. 13 : Stanovení antiradikálové aktivity vodného extraktu vzorku HJ

Navážka : 0,5014 g

objem vzorku [ml]	Hmotnost odparku [μg]	A _{DPPH}	A	% DPPH	průměrné %
0,1	3,001	0,311	0,269	13,50	11,87
		0,311	0,281	9,65	
		0,313	0,274	12,46	
0,3	9,004	0,311	0,193	37,94	37,33
		0,311	0,195	37,30	
		0,313	0,198	36,74	
0,5	15,006	0,311	0,146	53,05	52,83
		0,311	0,146	53,05	
		0,313	0,149	52,40	
0,6	18,007	0,311	0,114	63,34	62,86
		0,313	0,117	62,62	
		0,313	0,117	62,62	
0,8	24,010	0,311	0,066	78,78	78,55
		0,313	0,068	78,27	
		0,313	0,067	78,59	
1,0	30,012	0,311	0,039	87,46	88,05
		0,313	0,034	89,14	
		0,313	0,039	87,54	

Tab. č. 14 : Průměrná hodnota antiradikálové aktivity vodného extraktu vzorku HJ

Odparek [μg]	0,00	2,999	8,997	14,995	17,994	23,992	29,991
%	0,00	13,30	39,01	55,66	67,27	82,40	88,30

Tab. č. 15 : Stanovení antiradikálové aktivity methanolového extraktu vzorku HH

Navážka : 0,5020 g

objem vzorku [ml]	Hmotnost odparku [µg]	A _{DPPH}	A	% DPPH	průměrné %
0,5	7,610	0,507	0,364	28,21	27,40
		0,491	0,374	23,83	
		0,494	0,345	30,16	
1,0	15,220	0,507	0,273	46,15	43,88
		0,491	0,284	42,16	
		0,494	0,280	43,32	
1,4	21,308	0,507	0,192	62,13	58,00
		0,491	0,221	54,99	
		0,494	0,213	56,88	
1,8	27,396	0,497	0,145	70,82	71,52
		0,491	0,151	69,25	
		0,494	0,126	74,49	
2,0	30,440	0,497	0,118	76,26	74,83
		0,491	0,132	73,12	
		0,494	0,123	75,10	
2,2	33,484	0,497	0,075	84,91	83,66
		0,497	0,065	86,92	
		0,494	0,103	79,15	
2,5	38,050	0,497	0,040	91,95	92,58
		0,491	0,039	92,06	
		0,494	0,031	93,72	

Tab. č. 16 : Stanovení antiradikálové aktivity methanolového extraktu vzorku HH

Navážka : 0,5022 g

objem vzorku [ml]	Hmotnost odparku [μg]	A _{DPPH}	A	% DPPH	průměrné %
0,5	7,615	0,415	0,286	31,08	26,12
		0,393	0,303	22,90	
		0,394	0,298	24,37	
1,0	15,230	0,415	0,214	48,43	45,03
		0,393	0,228	41,98	
		0,394	0,218	44,67	
1,4	21,322	0,415	0,159	61,69	60,37
		0,393	0,163	58,52	
		0,394	0,154	60,91	
1,8	27,414	0,415	0,111	73,25	71,51
		0,393	0,118	69,97	
		0,394	0,113	71,32	
2,0	30,460	0,415	0,049	88,19	81,92
		0,393	0,085	78,37	
		0,394	0,082	79,19	
2,2	33,506	0,415	0,052	87,47	85,66
		0,393	0,075	80,92	
		0,394	0,045	88,58	
2,5	38,075	0,415	0,038	90,84	90,00
		0,393	0,042	89,31	
		0,394	0,040	89,85	

Tab. č. 17 : Stanovení antiradikálové aktivity methanolového extraktu vzorku HH

Navážka : 0,5045 g

objem vzorku [ml]	Hmotnost odparku [μg]	A _{DPPH}	A	% DPPH	průměrné %
0,5	7,650	0,398	0,286	28,14	24,17
		0,416	0,334	19,71	
		0,434	0,327	24,65	
1,0	15,300	0,398	0,231	41,96	44,10
		0,416	0,228	45,19	
		0,434	0,238	45,16	
1,4	21,420	0,398	0,188	52,76	56,26
		0,416	0,172	58,65	
		0,434	0,185	57,37	
1,8	27,540	0,398	0,125	68,59	67,71
		0,416	0,141	66,11	
		0,434	0,137	68,43	
2,0	30,600	0,398	0,080	79,90	78,68
		0,416	0,102	75,48	
		0,434	0,084	80,65	
2,2	33,660	0,398	0,061	84,67	85,61
		0,416	0,065	84,38	
		0,434	0,053	87,79	
2,5	38,250	0,398	0,041	89,70	90,22
		0,416	0,039	90,63	
		0,434	0,042	90,32	

Tab. č. 18 : Průměrná hodnota antiradikálové aktivity methanolového extraktu vzorku

HH

Odparek [μg]	0,00	7,625	15,250	21,350	27,450	30,500	33,550	38,125
%	0,00	25,90	44,34	58,21	70,25	78,48	84,98	90,93

Tab. č. 19 : Stanovení antiradikálové aktivity methanolového extraktu vzorku HJ

Navážka : 0,5015 g

objem vzorku [ml]	Hmotnost odparku [μg]	A _{DPPH}	A	% DPPH	průměrné %
0,3	3,228	0,382	0,335	12,30	12,32
		0,409	0,338	17,36	
		0,383	0,355	7,31	
0,5	5,380	0,382	0,292	23,56	21,73
		0,409	0,321	21,52	
		0,383	0,306	20,20	
1,0	10,760	0,382	0,207	45,81	44,43
		0,409	0,221	45,97	
		0,383	0,224	41,51	
1,4	15,064	0,382	0,182	52,36	58,03
		0,409	0,161	60,64	
		0,383	0,149	61,10	
1,8	19,368	0,382	0,117	69,37	68,10
		0,409	0,122	70,17	
		0,383	0,35	64,75	
2,0	21,520	0,382	0,080	79,06	77,94
		0,409	0,091	77,75	
		0,383	0,088	77,02	
2,2	23,672	0,383	0,065	83,03	83,50
		0,409	0,069	83,13	
		0,383	0,060	84,33	

Tab. č. 20 : Stanovení antiradikálové aktivity methanolového extraktu vzorku HJ

Navážka : 0,5006 g

objem vzorku [ml]	Hmotnost odparku [μg]	A _{DPPH}	A	% DPPH	průměrné %
0,3	3,222	0,412	0,380	7,77	13,20
		0,441	0,372	15,65	
		0,451	0,378	16,18	
0,5	5,370	0,412	0,343	16,75	18,06
		0,441	0,360	18,37	
		0,451	0,365	19,07	
1,0	10,740	0,412	0,288	30,10	31,25
		0,441	0,307	30,39	
		0,451	0,301	33,26	
1,4	15,036	0,412	0,183	55,58	55,59
		0,441	0,202	54,20	
		0,451	0,194	56,98	
1,8	19,332	0,412	0,141	65,78	65,27
		0,441	0,156	64,63	
		0,451	0,156	65,41	
2,0	21,480	0,412	0,121	70,63	70,46
		0,441	0,139	68,48	
		0,451	0,125	72,28	
2,2	23,628	0,412	0,072	82,52	81,51
		0,441	0,101	77,10	
		0,451	0,068	84,92	

Tab. č. 21 : Stanovení antiradikálové aktivity methanolového extraktu vzorku HJ

Navážka : 0,5010 g

objem vzorku [ml]	Hmotnost odparku [μg]	A _{DPPH}	A	% DPPH	průměrné %
0,3	3,224	0,415	0,338	18,55	13,78
		0,368	0,333	9,51	
		0,384	0,333	13,28	
0,5	5,374	0,415	0,319	23,13	22,02
		0,368	0,303	17,66	
		0,384	0,287	25,26	
1,0	10,748	0,415	0,242	41,69	38,45
		0,368	0,234	36,41	
		0,384	0,241	37,24	
1,4	15,047	0,415	0,211	49,16	49,61
		0,368	0,190	48,37	
		0,384	0,187	51,30	
1,8	19,346	0,415	0,139	66,51	63,38
		0,368	0,145	60,60	
		0,384	0,142	63,02	
2,0	21,496	0,415	0,115	72,29	68,86
		0,368	0,123	66,58	
		0,384	0,124	67,71	
2,2	23,646	0,415	0,091	78,07	76,99
		0,368	0,089	75,82	
		0,384	0,088	77,08	

Tab. č. 22 : Průměrná hodnota antiradikálové aktivity methanolového extraktu vzorku

HJ

Odparek [μg]	0,00	3,225	5,375	10,749	15,049	19,349	21,499	23,649
%	0,00	13,10	20,60	38,04	54,41	65,58	72,42	80,67

Tab. č. 23 : Antiradikálová aktivita hypericinů po semipreparativní izolaci z vodného extraktu vzorku HH

Hmotnost odparku [mg]	A_{DPPH}	A_0	$A_{vz.}$	ΔA	% DPPH	průměrné %
1,3508	0,324	0,313	0,217	0,096	29,62	30,14
			0,219	0,094	29,01	
			0,210	0,103	31,79	
1,3480	0,324	0,313	0,184	0,129	39,81	37,35
			0,199	0,114	35,19	
			0,193	0,120	37,04	
1,3488	0,325	0,267	0,230	0,037	11,38	12,51
			0,218	0,049	15,08	
			0,231	0,036	11,08	
1,3492	průměrné hodnoty					26,67

Antiradikálová aktivita je 19,7673%/mg odparku.

Tab. č. 24 : Antiradikálová aktivita hypericinů po semipreparativní izolaci z vodného extraktu vzorku HJ

Hmotnost odparku [mg]	A_{DPPH}	A_0	$A_{vz.}$	ΔA	% DPPH	průměrné %
1,1988	0,325	0,267	0,188	0,079	24,31	22,36
			0,200	0,067	20,62	
			0,195	0,072	22,15	
1,2000	0,303	0,254	0,171	0,083	27,39	30,47
			0,153	0,101	33,33	
			0,161	0,093	30,69	
1,1992	0,303	0,254	0,159	0,095	31,35	30,03
			0,154	0,100	33,00	
			0,176	0,078	25,74	
1,1993	průměrné hodnoty					27,62

Antiradikálová aktivita je 23,0301%/mg odparku.

Tab. č. 25 : Antiradikálová aktivita hypericinů po semipreparativní izolaci z methanolového extraktu vzorku HH

Hmotnost odparku [mg]	A _{DPPH}	A ₀	A _{vz.}	ΔA	% DPPH	průměrné %
0,7610	0,434	0,390	0,363	0,027	6,22	5,30
			0,371	0,019	4,38	
			0,393	-----	-----	
0,7615	0,423	0,385	0,335	0,050	11,82	12,14
			0,320	0,065	15,37	
			0,346	0,039	9,22	
0,7650	0,423	0,385	0,332	0,053	12,53	10,17
			0,354	0,031	7,33	
			0,340	0,045	10,64	
0,7625	průměrné hodnoty					9,20

Antiradikálová aktivita je 12,0656%/mg odparku.

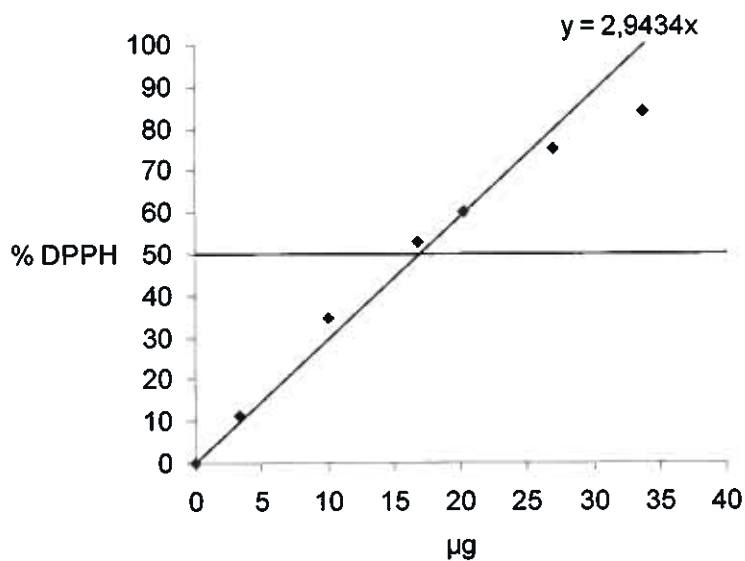
Tab. č. 26 : Antiradikálová aktivita hypericinů po semipreparativní izolaci z methanolového extraktu vzorku HJ

Hmotnost odparku [mg]	A _{DPPH}	A ₀	A _{vz.}	ΔA	% DPPH	průměrné %
0,5380	0,417	0,362	0,331	0,031	7,43	8,95
			0,314	0,048	11,51	
			0,329	0,033	7,91	
0,5370	0,417	0,362	0,299	0,063	15,11	13,99
			0,309	0,053	12,71	
			0,303	0,059	14,15	
0,5374	0,430	0,333	0,313	0,020	4,65	4,65
			0,340	-----	-----	
			0,313	0,020	4,65	
0,5375	průměrné hodnoty					9,20

Antiradikálová aktivita je 17,1163%/mg odparku.

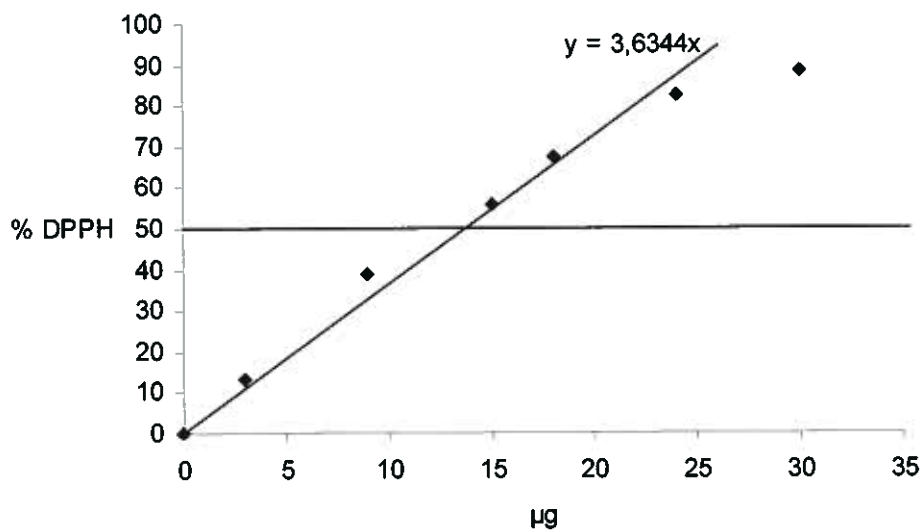
5.2. Grafy

Graf č. 1 : Závislost antioxidační aktivity na množství extrahovaných látek ve vodném extraktu vzorku HH



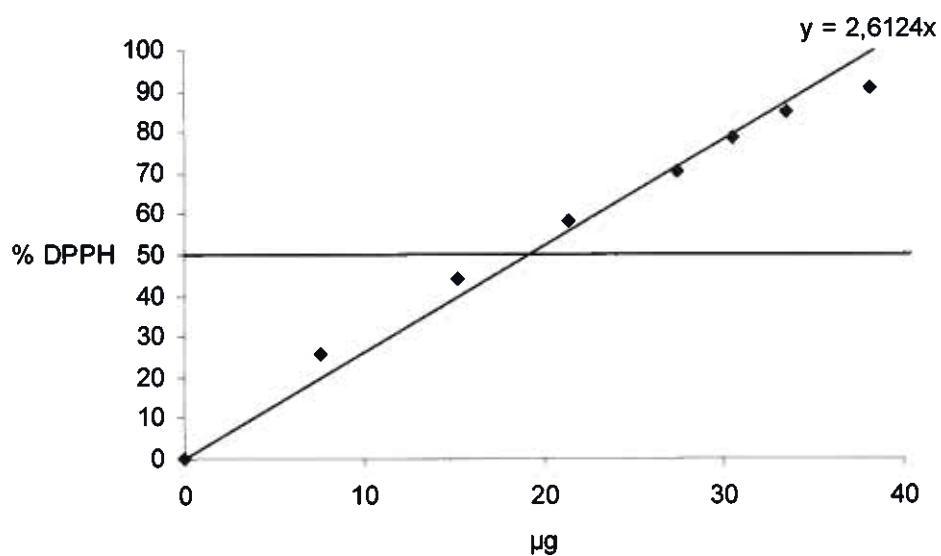
$$IC_{50} = 16,9872 \mu\text{g}$$

Graf č. 2: Závislost antioxidační aktivity na množství extrahovaných látek ve vodném extraktu vzorku HJ



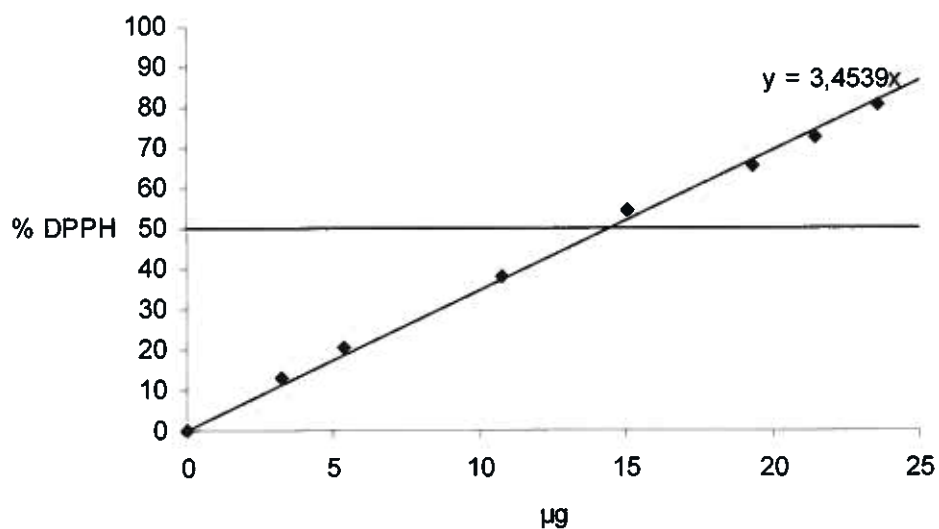
$$IC_{50} = 13,7574 \mu\text{g}$$

Graf č. 3 : Závislost antioxidační aktivity na množství extrahovaných látek v methanolovém extraktu vzorku HH



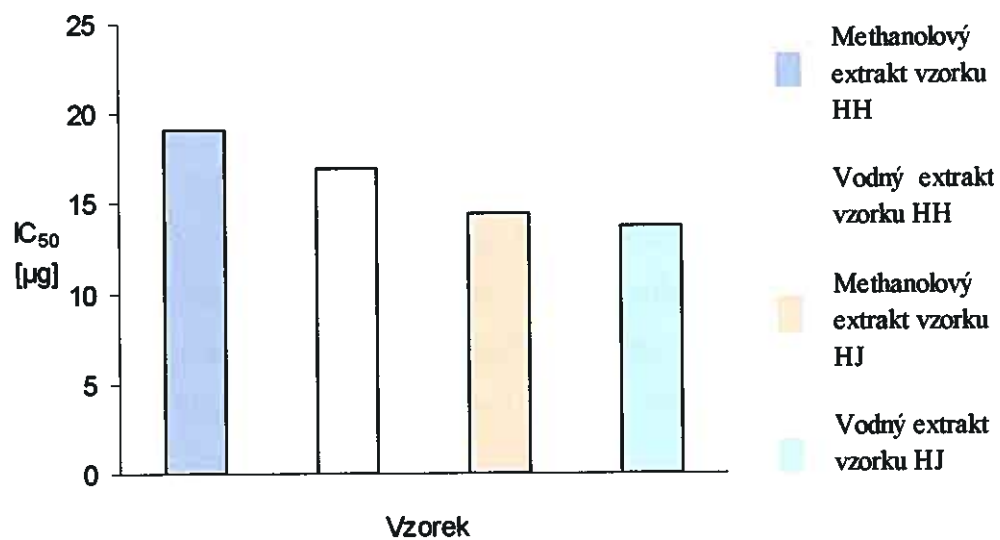
$$IC_{50} = 19,1395\mu\text{g}$$

Graf č. 4 : Závislost antioxidační aktivity na množství extrahovaných látek v methanolovém extraktu vzorku HJ

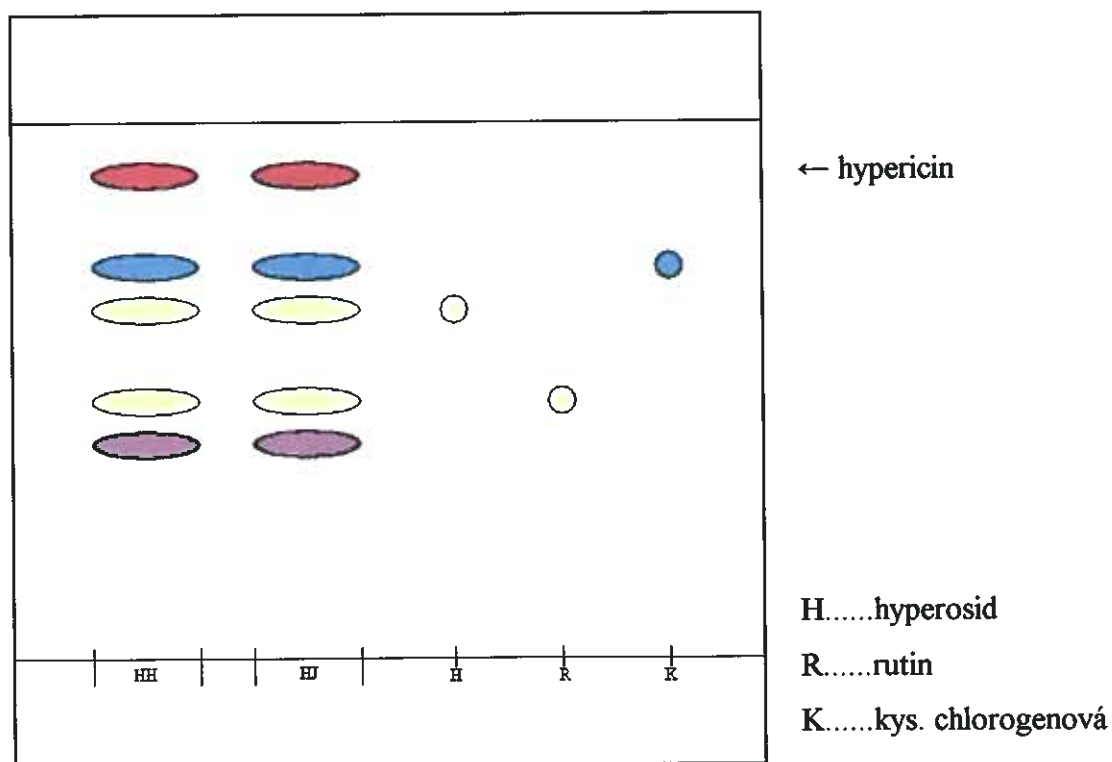


$$IC_{50} = 14,4764\mu\text{g}$$

Graf č. 5 : Porovnání antioxidační aktivity extraktů drogy



Obr. č. 1 : Důkaz obsahových látek v methanolvém extraktu pomocí TLC (viz kap. 4.8.3.)



6. DISKUZE

Volné radikály jsou běžným metabolitem buňky. Pokud je ale porušena rovnováha mezi jejich vznikem a odstraněním, kterou za normálních podmínek zajišťují antioxidační mechanismy každé buňky, může dojít k hromadění VR. Tento stav označovaný jako oxidační stres doprovází mnoho nemocí, ale může být i jejich původcem. Proto je nutné této nerovnováze zabránit. Pokud na to nestačí přirozené buněčné mechanismy, je vhodné je podpořit příjmem antioxidantů potravou. Z přírodních látek vykazují AA flavonoidy, fenolické sloučeniny, terpeny či kyselina askorbová. Příjem přírodních antioxidantů je lepší než syntetických, které jsou více toxické.

Flavonoidy a další polyfenolické sloučeniny vykazující antioxidační aktivitu jsou obsaženy v mnoha léčivých rostlinách, i v *Hypericum perforatum*, u níž jsem AA sledovala. Třezalková nať se tradičně využívá k léčbě psychických poruch.

Nositelem účinku je také hypericin jako hlavní obsahová látka extraktu třezalky. Jeho AA je způsobena přítomností OH skupin v molekule. Po semipreparativní izolaci hypericinu z extraktů pomocí tenkovrstvé chromatografie jsem provedla stanovení AA. Výsledky uvádí tab. č.23-26.

Antioxidační aktivitu extraktů jsem sledovala u drogy pocházející z Jablonce nad Nisou a ze Zahrady léčivých rostlin farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové.

Vlastní stanovení AA bylo provedeno měřením schopnosti odstranit radikály DPPH spektrofotometricky při $\lambda = 517\text{nm}$. Aktivita jednotlivých extraktů byla vyjádřena pomocí IC_{50} , která vyjadřuje množství extraktu, které zhasí polovinu radikálů DPPH. (viz graf č. 5) Extrakty drog ze dvou různých lokalit se lišily svou antioxidační aktivitou. Droga pocházející z Jablonce nad Nisou vykazovala nižší AA u obou extraktů. Tento rozdíl je způsoben různým zastoupením obsahových látek. U obou vzorků měli vyšší AA methanолоvé extrakty.

Kvalita obou vzorků byla hodnocena stanovením hypericinů a flavonoidů. Výsledky uvádí tab.1 a 2. Obsahem hypericinů vyhovují oba vzorky drogy lékopisu. Vyšší obsah obou sledovaných skupin látek byl v nati třezalky původem z Jablonce nad Nisou.

7. ZÁVĚR

1.) Byl vypracován přehled účinků a použití třezalky tečkované a antioxidační aktivity.

2.) Byla stanovena AA vodného a methanolového výluhu drogy *Hyperici herba* pocházející z Jablonce nad Nisou (HJ) a ze Zahrady léčivých rostlin farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové (HH), spektrofotometrickým měřením odstraňování radikálů DPPH. Vyjádřeno pomocí IC_{50} klesá AA v pořadí :

MeOH extrakt vzorku HH..... $IC_{50} = 19,1395\mu\text{g}$

H₂O extrakt vzorku HH..... $IC_{50} = 16,9872\mu\text{g}$

MeOH extrakt vzorku HJ..... $IC_{50} = 14,4764\mu\text{g}$

H₂O extrakt vzorku HJ..... $IC_{50} = 13,7574\mu\text{g}$

3.) Po semipreparativní izolaci hypericinů z extraktů drogy pomocí TLC byla stanovena jejich AA spektrofotometrickým měřením odstranění radikálů DPPH. AA vyjádřena pomocí % zhášení radikálů DPPH na mg odparku klesá v pořadí :

H₂O extrakt vzorku HJ.....23,0301 %/mg

H₂O extrakt vzorku HH.....19,7673 %/mg

MeOH extrakt vzorku HJ.....17,1163 %/mg

MeOH extrakt vzorku HH.....12,0656 %/mg

8. LITERATURA

1. Rubcov, V. G.; Beneš, K. : Zelená lékárna. Praha, Lidové nakladatelství, 1985, 270-273.
2. Podlech, D. : Kapesní atlas-Léčivé rostliny. Praha, Slovart, 2002, 46.
3. Benedí, J.; Arroyo, R.; Romero, C. et al. : Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells. *Life Sci.*, 2004; 75, 1263 – 1276.
4. Lawvere, S.; Mahoney, M. C. : St. John's Wort. *Am Fam Phisician.*, 2005; 72, 2249-54.
5. Exarchou, V.; Fiamegos, Y. C.; van Beek, A. T. et al. : Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants. *J Chromatogr A.*, 2005; 1112, 293-302.
6. Choudhuri, S.; Valerio, L. G. Jr. : Usefulness of studies on the molecular mechanism of action of herbals/botanicals : The case of St. John's wort. *J Biochem Mol Toxicol.* 2005; 19, 1-11.
7. Hosseinzadeh, H.; Karimi, G. R.; Rakhshanizadeh, M. : Anticonvulsant effect of *Hypericum perforatum* : role of nitric oxide. *J Ethnopharmacol.*, 2005; 98, 207-8.
8. Capasso, R.; Borrelli, F.; Montanaro, V. et al. : Effects of the antidepressant St. John's wort (*Hypericum perforatu*) on rat and human vas deferens contractility. *J Urol.*, 2005; 173, 2194-7.
9. El-Sherbiny, D.A.; Khalifa, A.E.; Attia, A.S. et al. : *Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav.*, 2003; 76, 525-33.
10. Caccia, S. : Antidepressant-like components of *Hypericum perforatum* extracts : an overview of their pharmacokinetics and metabolism. *Curr Drug Metab.*, 2005; 6, 531-43.
11. Dostálek, M.; Pistovčáková, J.; Jurica, J. et al. : Effect of St John's wort (*Hypericum perforatum*) on cytochrome P-450 activity in reperfused rat liver. *Life Sci.*, 2005; 78, 239-44.
12. Conforti, F.; Statti, G. A.; Tundis, R. : Comparative chemical composition and variability of biological activity of methanolic extracts from *Hypericum perforatum* L. *Nat Prod Res.*, 2005; 19, 295-303.

13. Zou, Y.; Lu, Y.; Wei, D. : Hypocholesterolemic effects of flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in rats fed a cholesterol-rich diet. *J Agric Food Chem.*, 2005; 53, 2462-6.
14. Zou, Y.; Lu, Y.; Wei, D. : Antioxidant activity of flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *J Agric Food Chem.*, 2004; 52, 5032-5039.
15. Paulke, A.; Schubert-Zsilavec, M.; Wurglics, M. : Determination of ST. John's wort flavonoid-metabolites in rat brain through high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2006; 832, 109-13.
16. Schempp, C. M.; Kiss, J.; Kirkin, V. : Hyperforin acts as an angiogenesis inhibitor. *Planta Med.*, 2005; 71, 999-1004.
17. 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.
18. Abdel-Salam, O. M. : Anti-inflammatory, antinociceptive, and gastric effects of *Hypericum perforatum* in rats. *Sci World J.*, 2005; 5, 586-95.
19. Perfumi, M.; Mattioli, L.; Forti, L. et al. : Effect of *Hypericum perforatum* CO₂ extract on the motivational properties of ethanol in alcohol-preferring rats. *Alcohol Alcohol.*, 2005; 40, 291-6.
20. Linde, K.; Mulrow, C. D.; Berner, M. et al. : St John's wort for depression. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2005; 2, CD000448.
21. Donovan, J. L.; De Vane, C. L.; Lewis, J. G. et al. : Effects of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract on plasma androgen concentrations in healthy men and women : a pilot study. *Phytother Res.*, 2005; 19, 901-6.
22. Kubin, A.; Wierrani, F.; Burner, U. et al. : Hypericin-the facts about a controversial agent. *Curr Pharm Des.*, 2005; 11, 233-53.
23. Randlov, C.; Mehlsen, J.; Thomsen, C. F. et al. : The efficacy of St John's Wort in patients with minor depressive symptoms or dysthymia – a double-blind placebo-controlled study. *Phytomedicine.*, 2006; 13, 215-21.
24. Luo, L.; Sun, Q.; Mao, Y. Y. et al. : Inhibitory effects of flavonoids from *Hypericum perforatum* on nitric oxide synthase. *J Ethnopharmacol.*, 2004; 93, 221-5.
25. Štípek, S. a kol. : Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Praha, Grada, 2000.

26. Szabo, M. : Léčíme se třezalkou : třezalka – slunce pro duši. Praha, Nakladatelství I. Železný, 2002.
27. Painter, F. M. : St John's wort (*Hypericum perforatum*) Monograph. *Sci Rev Alter Med.*, 2004; 9, 318-325.