

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra analytické chemie

VYUŽITÍ HPTLC V ANALÝZE LÉČIV PŘÍRODNÍHO PŮVODU

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:  
Hradec Králové 2015

PharmDr. Lucie Havlíková, Ph.D.  
Barbora Gajdošová

## **Prohlášení**

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

V Hradci Králové

Barbora Gajdošová

## **Poděkování**

Mé poděkování patří PharmDr. Lucii Havlíkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

## Obsah

Seznam použitých zkratek .....	6
1. Úvod .....	7
2. Cíl a popis zadání práce.....	7
3. Chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography, TLC) .....	7
3.1. Princip chromatografie.....	8
3.2. Princip a rozdělení TLC .....	8
4. Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (High-Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC) .....	10
4.1. Jednotlivé kroky při postupu HPTLC a vhodné přístroje .....	12
4.1.1. Nanášení vzorků a standardů .....	12
4.1.2. Vyvíjení chromatogramu .....	15
4.1.3. Derivatizace .....	18
4.1.4. Vyhodnocení: detekce.....	21
4.1.5. Vyhodnocení: dokumentace, TLC-MS, bioluminiscence.....	22
5. Analýza léčivých rostlin pomocí HPTLC .....	25
5.1. Přehled a charakteristika léčivých rostlin .....	26
5.1.1. Aloe pravá ( <i>Aloe vera</i> ).....	26
5.1.2. Fíkovník posvátný ( <i>Ficus religiosa</i> ).....	26
5.1.3. Henovník bílý ( <i>Lawsonia dermis</i> ) .....	27
5.1.4. Heřmánek pravý ( <i>Matricaria recutita</i> ).....	27
5.1.5. Měsíček zahradní ( <i>Calendula officinalis</i> ).....	28
5.1.6. Náduť zpeřená ( <i>Bryophyllum pinnatum</i> ) .....	28
5.1.7. Pampeliška (Smetánka) lékařská ( <i>Taraxacum officinale</i> ) .....	28
5.1.8. Pelyněk pravý ( <i>Artemisia absinthium</i> ) .....	29
5.1.9. Rozmarýna lékařská ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) .....	29
5.1.10. Sezam indický ( <i>Sesamum indicum</i> ) .....	30

5.1.11.	Šáchor hlíznatý ( <i>Cyperus rotundus</i> ) .....	30
5.1.12.	Vyvinutec kuřímorový ( <i>Evolvulus alsinoides</i> ) .....	31
5.1.13.	Zázvor lékařský ( <i>Zingiber officinale</i> ) .....	31
5.1.14.	Zmijovice hadová ( <i>Rauvolfia serpentina</i> ) .....	31
5.1.15.	Ženšen pravý ( <i>Panax ginseng</i> ) .....	32
5.2.	Ukázky celého postupu analýzy pomocí HPTLC .....	37
5.2.1.	Postup při analýze aloe vera gelu .....	37
5.2.2.	Postup při analýze vyvinutce kuřímorového .....	39
6.	Závěr.....	42
7.	Seznam zdrojů .....	44

## Seznam použitých zkratek

A7G	Apigenin 7-O-glukosid
ADC2	Automatická vyvíjecí komora 2 (Automatic Developing Chamber 2)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HDRI	Vysoký dynamický rozsah obrazů (High Dynamic Range Images)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HPTLC	Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie (High-Performance Thin Layer Chromatography)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
SOP	Standardní operační postup (Standard Operating Procedure)
TČM	Tradiční čínská medicína
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography)
TLC-MS	Tenkovrstvá chromatografie tandemově s hmotnostní spektrometrií
UV	Ultrafialové záření
VIS	Viditelné záření

# 1. Úvod

Dané téma jsem si zvolila zejména proto, že mě zajímá působení léčivých látek obsažených v rostlinách na lidský organismus. Léčba rostlinami neboli fytoterapie se používá už od pradávna, zvláště pak v tradiční čínské a indické medicíně. Každá léčivá rostlina, respektive její jednotlivé části, obsahují účinné látky např. glykosidy, flavonoidy, alkaloidy, terpenoidy, silice, atd., které lze v dnešní době jednoduše vyextrahovat a účinně používat buď jako čisté substance nebo jako součást řady rostlinných přípravků. Ne všechny účinné látky rostlin působí na člověka terapeuticky. Proto by se neměly zanedbávat jejich vedlejší a nežádoucí účinky. Pro všechny zmíněné účely lze velmi dobře použít chromatografické metody, které jsou momentálně nepoužívanějšími a nejvýznamnějšími analytickými metodami k separaci analytů.

## 2. Cíl a popis zadání práce

Cílem této práce je seznámit se s metodikou a přístrojovým vybavením vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie a jejím využitím v analýze léčiv přírodního původu.

Práce je strukturována do tří hlavních částí. První část popisuje základní informace o tenkovrstvé chromatografii a chromatografii jako takové. Druhá část je zaměřená na vysokoúčinnou tenkovrstvou chromatografii, obsahuje rovněž detailnější zpracování jednotlivých kroků analýzy. Třetí část se zabývá několika léčivými rostlinami, které se používají hlavně v tradiční čínské a indické medicíně a jejich analytickým hodnocením pomocí vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie.

## 3. Chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography, TLC)

Chromatografie na tenké vrstvě patří k snadným, často používaným a finančně nenáročným separačním metodám pro kvalitativní i kvantitativní analýzu, která umožňuje současnou analýzu mnoha látek za minimální časový úsek. TLC lze provádět

jednoduše a levně i manuálně, proto se nachází v mnoha laboratořích jako vhodný nástroj pro jednoduché a rychlé separace (1).

Chromatografie na tenké vrstvě se řadí k univerzálním a často používaným chromatografickým metodám. Koncept TLC je jednoduchý a vzorky obvykle nevyžadují speciální předzpracování. Toho se hojně využívá ve farmaceutických a klinických analýzách, v průmyslové chemii, v environmentální toxikologii, v potravinové chemii, v kosmetických a rostlinných materiálech a v analýze rostlin.

Ještě před několika lety byla TLC stagující a zapomínanou technikou kvůli nízké citlivosti, špatnému rozlišení a reprodukovatelnosti. V dnešní době je mnoho stupňů této techniky automatizováno a ovládáno instrumentálně ve formě moderního vysokoúčinného tenkovrstvého chromatografického systému, který umožňuje manipulaci velkého počtu vzorků v jednom chromatografickém oběhu. Rychlost separace, vysoká citlivost a dobrá reprodukovatelnost vyplývá z vyšší kvality chromatografických vrstev a neustálého zlepšování instrumentálního vybavení (2).

### **3.1. Princip chromatografie**

Obecný princip chromatografického dělení spočívá v mnohonásobném, opakovaném ustalování rovnováhy složek analyzované směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. První fáze je nepohyblivá (stacionární) a má schopnost zadržovat jednotlivé součásti analyzované směsi různou měrou. Druhá fáze je pohyblivá (mobilní). Tato má za úkol vymývat (eluovat) jednotlivé součásti směsi z nepohyblivé fáze a odnášet je ve směru toku různou rychlostí, čímž dochází k jejich oddělení.

Nepohyblivá fáze může být buď tuhá, nebo kapalná látka. Pohyblivá fáze bývá buď kapalná (eluent, eluční činidlo), nebo plynná (nosný plyn) (3).

### **3.2. Princip a rozdělení TLC**

V případě chromatografie na tenké vrstvě jde o rozdělování analytů mezi fází tuhá látka – kapalina nebo mezi fází kapalina – kapalina. Na startovací místo se nanese vzorek ve formě malé kulaté skvrny na papír nebo tenkou vrstvu. Tenká vrstva slouží sama jako pevná fáze, která se zúčastní dělicího pochodu nebo se využívá jako nosič



fáze stacionární. Tenká vrstva (papír) se posléze vloží do uzavřené vyvíjecí komory s mobilní fází a jejími parami tak, aby pozice nanesených analytů zůstaly nad hladinou mobilní fáze. Mobilní fáze se nechá vzlínat póry tenké vrstvy (papíru). Hybnou silou mobilní fáze jsou kapilární síly. Rychlost pohybu mobilní fáze závisí na velikosti pórů stacionární fáze. Mobilní fáze unáší ze vzorku dělené látky, které se více či méně zpožďují interakcí (rozpuštěním nebo adsorpcí) se stacionární fází, a tím se vzájemně dělí. Záleží tedy na brzdící síle (retenci), která působí na analyty selektivně. To znamená, že některá látka je bržděna více, jiná méně. Rychlost postupu látky závisí na sorpční rovnováze. Čím pevněji se látka sorbuje na stacionární fází, tím pomaleji chromatografickým systémem postupuje. Vyvíjení se ukončí odebráním chromatogramu z komory, když čelo mobilní fáze dosáhne požadované vzdálenosti (většinou blízko protilehlého konce tenké vrstvy nebo papíru). Vzdálenost čela mobilní fáze od startu se označí měkkou tužkou. Chromatogram se dá sušit. Skvrny nebarevných analytů je třeba před vyhodnocováním chromatogramu detegovat pomocí vhodných detekčních metod (3, 4, 5).

Podle základních druhů dělicích pochodů se chromatografie na tenké vrstvě rozděluje na dva základní typy:

- a) **Rozdělovací chromatografie**, kde stacionární fáze je kapalina zachycená na tenké vrstvě a mobilní fáze je rovněž kapalina.
- b) **Adsorpční chromatografie**, kde stacionární fáze je tuhý adsorbent, který je součástí tenké vrstvy a mobilní fáze je kapalina (4, 5).

Mezi nejvyužívanější stacionární fáze patří: oxid hlinitý, silikagel, celulóza, iontoměniče, polyamid, modifikovaný silikagel. Stacionární fáze jsou nanесeny na skleněných deskách nebo hliníkových foliích. Zrnitost stacionární fáze je v rozmezí pěti až čtyřiceti mikrometrů.

Nejčastější mobilní fáze: cyklohexan, toluen, chloroform, dichlormetan, aceton, ethanol, methanol, voda, amoniak, kyselina octová a jejich směsi (5).

## 4. Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie (High-Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC)

Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie je důmyslná instrumentální technika založená na kompletních dovednostech chromatografie na tenké vrstvě. Výhody jako automatizace, skenování, plná optimalizace, selektivní detekční principy, minimální příprava vzorku, spojovací (tandemové) techniky atd. jí umožňují být silným analytickým nástrojem pro získání chromatografické informace o komplexních směsích anorganických a organických molekul a biomolekul (2).

HPTLC je celistvý koncept zahrnující široce standardizovanou metodiku založenou na vědeckých poznacích stejně jako použití validované metody pro kvantitativní a kvalitativní analýzu. HPTLC splňuje všechny požadavky na kvalitu dnešních analytických laboratoří, a to i v plně regulovaném prostředí (1).

Základním rozdílem mezi metodou HPTLC a TLC je miniaturizace celého zařízení. U HPTLC se dosahuje zlepšení dělicích vlastností použitím tenké rovnoměrné vrstvy jemně vytřídněného mikropórovitého silikagelu. Na jednu chromatografickou vrstvu lze nanést až desetkrát více vzorků než při klasické tenkovrstvé chromatografii. Využití se provádí v komorách běžného typu s atmosférou dobře nasycenou mobilní fází. Součástí HPTLC bývá zařízení umožňující automatické proměřování skvrn (měření absorpce, fluorescence) (6).

**Tabulka č. 1:** Přehled rozdílů mezi TLC a HPTLC (1, 6, 7).

<i>Parametr</i>	<i>HPTLC</i>	<i>TLC</i>
<i>Technika</i>	Automaticky/ instrumentální	Manuální
<i>Používaná chromatografická deska</i>	Předem potažená	Ručně potažená/ předem potažená
<i>Střední velikost částic</i>	5 – 6 μm	10 – 12 μm
<i>Tloušťka vrstvy sorbentu</i>	100 μm	250 μm
<i>Předběžná úprava desky (promytí)</i>	Musí proběhnout	Neprovádí se

<i>Výška desky</i>	12 $\mu\text{m}$	30 $\mu\text{m}$
<i>Pevný nosič</i>	Velký výběr stacionárních fází, silikagel pro normální fáze a C <sub>8</sub> , C <sub>18</sub> pro reverzní fáze	Silikagel, hliníkový a křemičitanový
<i>Aplikace vzorku</i>	Poloautomatická/ automatická	Manuální/ poloautomatická
<i>Efektivnost</i>	Vysoká vzhledem k menší velikosti částic	Nižší
<i>Objem nanášeného vzorku</i>	0,5 – 1 $\mu\text{l}$	1 – 5 $\mu\text{l}$
<i>Počáteční průměr skvrny</i>	1 – 1,5 mm	3 – 6 mm
<i>Průměr odseparovaných skvrn</i>	2 – 5 mm	6 – 15 mm
<i>Tvar nanášené skvrny</i>	Bod/ pruh	Bod
<i>Vyvíjecí komora</i>	Vyžaduje menší množství mobilní fáze	Vyžaduje větší množství mobilní fáze
<i>Čas analýzy</i>	Rychlý	Pomalejší
<i>Množství látky ve skvrně při měření absorpce (detekční limit)</i>	100 – 500 pg	1 – 5 ng
<i>Množství látky ve skvrně při měření fluorescence (detekční limit)</i>	5 – 10 pg	50 – 100 pg
<i>Reprodukovatelnost výsledků</i>	Reprodukovatelné	Obtížně reprodukovatelné
<i>Kvantifikace</i>	Přítomna	Pro komplikovanost metody nelze v tomto uspořádání jednoznačně určit
<i>Přehled skenování</i>	Použití UV/ viditelného / fluorescenčního skeneru ke kvalitativnímu a kvantitativnímu prohledání	Skenování není možné

	celého chromatogramu, skener je moderní typ denzitometru	
<i>Robustnost</i>	Dobrá	Menší

#### 4.1. Jednotlivé kroky při postupu HPTLC a vhodné přístroje

Je pouze několik výrobců, kteří poskytují špičkové přístroje, software a spotřební materiál pro všechny kroky při postupu TLC a HPTLC.

##### 4.1.1. Nanášení vzorků a standardů

V planární (plošné) chromatografii je aplikace vzorku prvním krokem v průběhu práce, čímž se podstatně ovlivňuje kvalita výsledku na konci procesu.

Výběr aplikační techniky a přístrojů závisí na požadavcích přesnosti, objemu vzorků, počtu analýz a požadovaném stupni automatizace.

Nejjednodušší aplikace vzorku se provádí pomocí kapiláry s přesně definovaným objemem. Objem vzorku od 0,5 do 5  $\mu\text{l}$  může být aplikován jako skvrna na chromatografickou desku obvykle bez sušení. U HPTLC se většinou nanáší okolo 1  $\mu\text{l}$  objemu vzorku na skvrnu. Kapiláru se doporučuje vést prostřednictvím nanomatu.

Nanesení vzorku jako úzkého pruhu připouští aplikaci podstatně většího objemu, přičemž startovací zóna v této formě zajišťuje nejlepší výsledky, jaké mohou být dosaženy s vybraným chromatografickým systémem.

Příliš velký objem vzorků nebo vzorky s vysokým obsahem matrice mohou být nanášeny ve formě obdélníků (1).

Pro snadné ruční nanesení vzorků ve formě obdélníkových skvrn se používá **Nanomat 4 a kapilární dávkovač** (obr. 1). Nanomat 4 zajišťuje přesné nanášení vzorku bez poškození vrstvy na chromatografické desce. Dávkování vzorku se provádí pomocí jednorázové kapilární pipety, která je přesně kalibrována, což zajišťuje, že chromatogram může automaticky skenovat podle naprogramovaného vzoru. Nanomat 4 a kapilární dávkovač je vhodný zejména pro základní sestavu HPTLC (1).



**Obr. 1:** Nanommat 4 a kapilární dávkovač. Manuální dávkování s jednorázovými pipetami (1).

Pro poloautomatické nanášení vzorků je vhodné použít **Linomat 5** (obr. 2). Linomat 5 umožňuje nanášení vzorků na TLC/HPTLC desky ve formě pásů s dusíkem nebo stlačeným vzduchem. Nanášení vzorků je tedy automatické. Pouze výměna injekční stříkačky (plnění, vkládání a oplachování) se provádí manuálně. Linomat je vhodný pro rutinní použití (1).



**Obr. 2:** Linomat 5 pro poloautomatické nanášení vzorků (1).

**Automatický TLC vzorkovač 4** (automatic TLC sampler 4, ATS 4, obr. 3) je klíčovým faktorem pro produktivitu HPTLC laboratoře. Tento přístroj splňuje veškeré požadavky, k nimž je určen (např. přesnost, robustnost při běžném používání a pohodlnou manipulaci). ATS 4 nabízí plně automatickou aplikaci vzorků pro kvalitativní a kvantitativní analýzu, jakož i pro preparativní separace. Je vhodný pro běžné použití a má vysokou kapacitu, pokud jde o analýzu velkého množství vzorků (1).



**Obr. 3:** Automatický TLC dávkovač 4 (Automatic TLC sampler 4, ATS 4). Plně automatický dávkovač vzorků (1).

#### 4.1.2. Vyvíjení chromatogramu

Tenkvrstvá chromatografie se liší od všech ostatních chromatografických technik v tom, že vedle mobilní a stacionární fáze je přítomna i fáze plynná. Tato plynná fáze může významně ovlivnit výsledek separace (1).

Proces ve vyvíjecí komoře je následující. Chromatografická deska je vložena do vývojové komory, ve které je pár centimetrů vyvíjecího rozpouštědla – dostatečné množství pro vzlínání mobilní fáze po chromatografické desce, ale zároveň nižší než startovací linie na desce, kde jsou nanesené vzorky.

Čtyři částečně konkurenční procesy nastanou za předpokladu, že je komora zavřená. Mezi součásti vyvíjecího rozpouštědla a jejich výparů bude v konečné fázi ustanovena rovnováha, nazývána jako nasycení komory. Závislost na tlaku výparů jednotlivých komponent z plynné fáze se může významně lišit od vyvíjecího rozpouštědla.

a) Mezitím, co se suší chromatografická deska, stacionární fáze adsorbuje molekuly z plynné fáze. Tento proces, adsorpční nasycení, se také přibližuje rovnováze,

ve které budou polární součásti odebrány z plynné fáze a přeneseny na povrch stacionární fáze.

b) Současně ta část vrstvy, která už je navlhčená mobilní fází, interaguje s plynnou fází. Tímto jsou zejména nejméně polární části kapaliny uvolněny do plynné fáze.

c) Během migrace mohou být složky mobilní fáze odděleny stacionární fází za určitých podmínek, což způsobuje tvorbu sekundárního čela (1).

### **Vybírání vyvíjecí komory**

Vybírání vhodné komory je prováděno během metody vyvíjení a obecně zahrnuje praktické posouzení hledisek jako je třeba komora, která je k dispozici, která musí být použita v rámci standardního operačního postupu (SOP), nebo která byla použita v předešlých analýzách, pokud musí být provedeno srovnání. Nicméně by měl být brán ohled také na ekonomické aspekty, jako je požadavek času a spotřeba rozpouštědel (1).

**Vyvíjecí dvoužlábková komora** (obr. 4) nabízí několik způsobů jak specificky ovlivnit a vylepšit TLC/ HPTLC separaci (1).



**Obr. 4:** Vyvíjecí dvoužlábková komora (1).

V **horizontální vyvíjecí komoře** (obr. 5) je HPTLC deska vyvíjena z obou protilehlých stran směrem do středu. Díky tomu je možné počet analyzovaných vzorků



zdvojnásobit ve srovnání s vývojem v chromatografické komoře, a to za předpokladu, že vyvíjecí dráha 45 mm (50 mm minus vzdálenost od kraje 5 mm) je dostačující (1).



**Obr. 5.** Horizontální vyvíjecí komora (1).

**SmartALERT** (Obr. 6) – monitorování čela rozpouštědla se používá pro spolehlivé sledování TLC/ HPTLC desky vyvíjené ve skleněné komoře. Požadovanou vzdálenost čela si nastaví sám uživatel. Nastavená vzdálenost je monitorována světelným paprskem a snímačem. Pokud mobilní fáze dosáhne zvolené vyvíjecí vzdálenosti, upozorní smartALERT obsluhu vizuálním a akustickým signálem (1).



**Obr. 6:** SmartALERT pro monitorování čela mobilní fáze (1).

**Automatická vyvíjecí komora 2** (Automatic Developing Chamber 2, ADC2), (Obr. 7) poskytuje vyvíjecí krok zcela automaticky, reprodukovatelně a nezávisle na vlivu prostředí. Činnost a předběžná úprava vrstev, nasycení komory, rozvoj vzdálenosti a konečné sušení lze přednastavit a monitoruje se automaticky. ADC2 představuje komfortní, jistý a reprodukovatelný způsob pro isokratický vývoj TLC či HPTLC desky a fólie o formátu 20 x 10 cm (1).



**Obr. 7:** Automatická vyvíjecí komora 2 (ADC2) (1).

### 4.1.3. Derivatizace

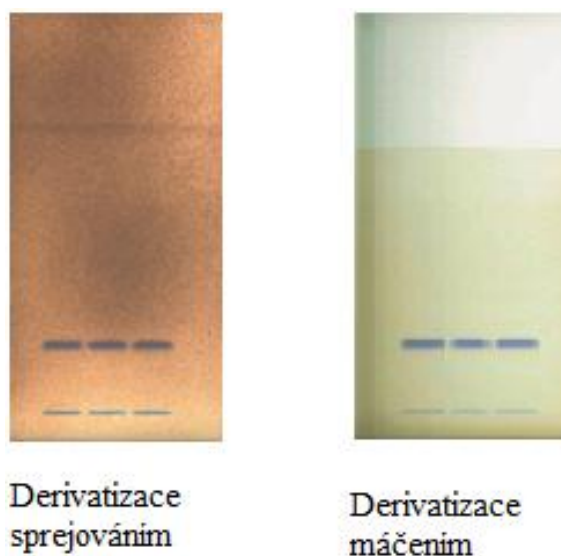
Nebarevné substance nebo substance bez chromoforů mohou být vizualizovány, nebo být detekovatelnější pomocí derivatizace.

Podstatnou výhodou tenkovrstvé chromatografie je, že jednotlivé frakce zůstanou umístěny na desce a mohou být derivatizovány až po chromatografii. Po derivatizaci se stávají detekovatelné takové substance, které nereagují na viditelné nebo UV světlo. V mnoha případech mohou být látky nebo třídy látek identifikovány

pomocí specifických činidel. Derivatizace lze dosáhnout plynem, kapalným postříkáním nebo máčením (ponořením). V každém případě je potřeba, aby bylo činidlo homogenně převedeno na chromatogram.

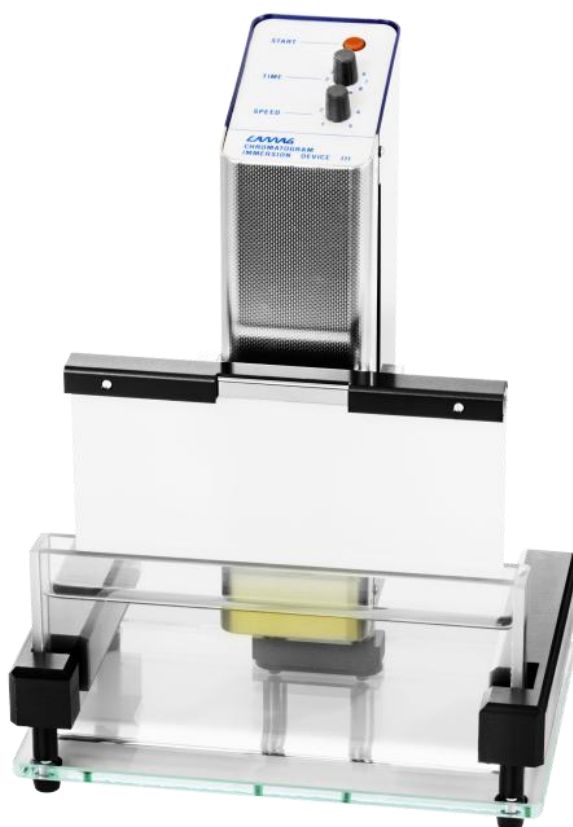
Pokud je činidlo vhodné, upřednostňuje se derivatizace máčením před sprejováním, neboť po derivatizaci máčením je interpretace výsledků jasnější (obr. 8). Nicméně sprejování je nejrozšířenější jednoduchá a rychlá metoda k přenášení činidla na TLC desku. Není k tomu třeba žádné speciální vybavení a pracuje se pouze s malými objemy. Vedle toho je sprejování velmi flexibilní a nezbytné, pokud mají být činidla nanášena po sobě. Na druhou stranu, sprejování vytváří podstatně větší množství nebezpečných výparů, které musí být opatrně odstraněny.

Nejlépeších výsledků je však dosaženo bez použití derivatizace (1).



**Obr. 8:** Ukázka rozdílu mezi derivatizací sprejováním a derivatizací máčením (1).

**Ponorný přístroj pro chromatogram** (obr. 9). Pro náležité provedení máčením musí být chromatogram ponořený a stažený regulovanou jednotnou rychlostí. Tím, že se udržuje vymezená rychlost a doba ponoření, mohou být derivatizační podmínky standardizovány a „proudy značek“, které mohou zasahovat denzitometrickým hodnocením, jsou vyloučeny (1).



**Obr. 9:** Ponorný přístroj pro chromatogram (1).

**TLC/HPTLC postřikovač** (obr. 10) se skládá z nabíječky a čerpací jednotky se dvěma druhy stříkacích hlav. Jeden typ je pro roztoky s normální viskozitou, druhý typ pro kapaliny s vyšší viskozitou (1).



Rozprašovač činidla (atomizér)

TLC/HPTLC postřikovač

**Obr. 10:** TLC/HPTLC postřikovač a atomizér (1).

#### 4.1.4. Vyhodnocení: detekce

Chromatogram je vyhodnocován pod bílým nebo ultrafialovým světlem. Možnosti sahají od vizuální kontroly elektronických obrazů až ke kvantitativnímu stanovení pomocí videa nebo skenování denzitometrií.

Plně vybavená laboratoř pro tenkovrstvou chromatografii by měla být schopna uchýlit se jak ke klasické denzitometrii, tak k elektronickému snímání obrazu.

Klasická denzitometrie používá monochromatické světlo a štěrbinu nastavitelné délky a šířky pro skenování stopy chromatogramu a měření rozptýleného světla. Absorpční spektra pro identifikaci látek a pro výběr nejvhodnější měřitelné vlnové délky může být zaznamenán v rozsahu 190 až 900 nm.

Mezi přednosti klasické denzitometrie patří spektrální rozlišení světelného zdroje a vyšší reprodukovatelnost kvantitativního stanovení (1).

Produktem používaným pro detekci je **TLC SKENER 4** (vyobrazen na obr. 11). Představuje pracovní stanici pro denzitometrické hodnocení TLC/HPTLC chromatogramů a ostatních planárních objektů (1).



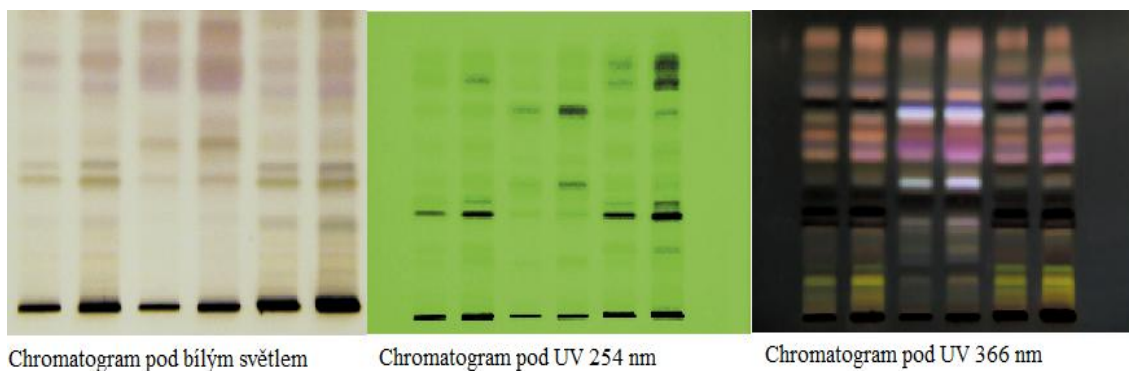
**Obr. 11:** TLC SKENER 4 pro denzitometrické hodnocení. Používá se v rozšířených soupravách pro TLC/HPTLC (1).

#### **4.1.5. Vyhodnocení: dokumentace, TLC-MS, bioluminiscence**

Pro dokumentaci jsou elektronické obrazy snadno zachytitelné a archivovatelné. Mohou být reprodukovány na obrazovce, aniž by se časem měnily, a tak porovnatelné se současnými obrazy. Spojení TLC-MS a bioluminiscence rozšiřují možnosti TLC.

Chromatogram se hodnotí pomocí elektronického snímání obrazu za použití polychromatického světla (bílé světlo, UV 254 nm a UV 366 nm; zobrazené na obr. 12), s nímž se celý objekt osvětlí. K zachycení elektronického snímku se využívá digitální fotoaparát pro dokumentaci tenkovrstvých chromatogramů.

Přednost elektronického snímání obrazu tkví v prohlížení úplného obrazu chromatogramu. Tato možnost získání „vizuálního dojmu“ je jednou z hlavních výhod tenkovrstvé chromatografie ve srovnání s ostatními chromatografickými technikami. Chromatogramy jsou archivovány pro přezkoumání a přístupné pro pozdější ověření nebo kvantitativní hodnocení odlišným softwarem (1).



**Obr. 12:** Zobrazení chromatogramů pod polychromatickým světlem (1).

Produkty používané pro dokumentaci, TLC- MS a bioluminiscenci jsou:

Dokumentační systém, **TLC vizualizér** (znázorněn na obr. 13), zachytí obrazy TLC nebo HPTLC desek. Společně s visionCATS (software pro HPTLC) TLC vizualizér zaručuje nízkou hlučnost, vysoký dynamický rozsah obrazů (high dynamic range images, HDRI) a komplexní sadu nástrojů pro zlepšení obrazu. Systém poskytuje osvětlení bílým světlem, UV 254 nm a UV 366 nm (1).



**Obr. 13:** TLC vizualizér pro obrazovou dokumentaci (1).



**Bioluminizer** (zobrazen na obr. 14) je detekční systém vyvinutý speciálně ke zjištění bioluminiscence na HPTLC desce (1).



**Obr. 14:** Bioluminizer – detekční systém vyvinutý k detekci bioluminiscence (1).

**Přístroj pro TLC-MS techniku** (obr. 15) představuje výkonné řešení ve spojení tenkovrstvé chromatografie a hmotnostní spektrometrie (MS), čímž se otvírají nové možnosti pro obě uvedené techniky. Mezi klíčové vlastnosti patří: rychlost a eluce vybraných zón bez kontaminace, online přenos do hmotnostního spektrometru, kompatibilita se všemi běžnými systémy vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s MS (HPLC-MS), identifikace neznámých látek na hranici detekce a nízká spotřeba rozpouštědla (1).





**Obr. 15:** Příklad přístroje pro TLC-MS techniku (1).

## 5. Analýza léčivých rostlin pomocí HPTLC

Ověřování pravosti a stálosti kvality jsou základními předpoklady jak pro tradiční indické lékařství (Ájurvéd) a tradiční čínskou medicínu (TČM), tak pro jejich komerční produkty, a to bez ohledu na typ výzkumu prováděném za účelem modernizace Ájurvédy a TČM. S ohledem na velké množství neznámých faktorů v Ájurvédě a TČM je nemožné a zbytečné kvalitativně a kvantitativně určovat každou složku obsaženou v bylinném léku. Chromatografická „fingerprinting“ analýza je racionální metoda jak „uspokojit potřeby“ efektivnějšího a výkonnějšího zhodnocení kvality. Analytické separační techniky, např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie (anglicky High-Performance Liquid Chromatography, HPLC), plynová chromatografie (anglicky Gas Chromatography, GC) a hmotnostní spektrometrie (anglicky Mass Spectrometry, MS) patří k nejpopulárnějším metodám při výběru používaných metod pro zhodnocení kontroly kvality surovin a hotových bylinných produktů. „Fingerprinting“ analýza prováděná pomocí HPTLC se stala nejúčinnějším nástrojem

pro kontrolu kvality rostlinných léčivých přípravků díky své spolehlivosti a jednoduchosti. Tato analýza může sloužit jako nástroj pro identifikaci, ověřování a kontrolu kvality bylinných léků (2).

Tato část bakalářské práce je věnována patnácti léčivým rostlinám, u kterých byla prováděna analýza pomocí HPTLC. Některé z uvedených rostlin rostou v České Republice, ale většina z nich je pěstována spíše v tropických či subtropických oblastech. Ke každé rostlině je napsána krátká charakteristika v podobě místa výskytu nebo původu rostliny, léčivých či toxických účinků na člověka a charakteristických obsahových látek. Dále je uvedena tabulka (tabulka č. 2) s přehledem prováděné analýzy na jednotlivých léčivých bylinách či dřevinách.

## **5.1. Přehled a charakteristika léčivých rostlin**

### **5.1.1. Aloe pravá (*Aloe vera*)**

Aloe pravá je vytrvalá rostlina podobná kaktusu. Většina druhů aloe se pěstuje v teplém podnebí severní, východní a jižní Afriky, v Indii a Číně.

Aloe je terapeuticky používána již od roku 1750 a její léčivé vlastnosti byly připisovány vnitřnímu čirému gelu z listů. Dnes je gel z aloe pravé známou složkou v řadě široce dostupných a inzerovaných kosmetických produktů (např. šampony, pěny do koupele, opalovací krémy, tělová mléka pro suchou pokožku atd.). Aloe vera gel je běžně používaný v přírodní medicíně, neboť působí jako antidiabetikum, protirakovinně, protizánětlivě, pomáhá léčit zranění, zlepšuje trávicí funkce, je antimikrobiální a pomáhá při popáleninách.

Hlavní složkou aloe vera gelu jsou aloeverosa, glukóza a kyselina jablečná (8, 9).

### **5.1.2. Fíkovník posvátný (*Ficus religiosa*)**

Fíkovník, stálezelený, vytrvalý strom, pochází z tropické Asie, indického subkontinentu a indočínské oblasti.

Fíkovník byl tradičně používaný v indickém lidovém léčitelství jako lék na respirační a některá kožní onemocnění. Kůra má stahující, chladící a projímavé

účinky. Používá se i při léčbě diabetu, nervových poruch, vaginálních a jiných močopohlavních obtíží. Listy se používají při průjmech a úplavici, rozemleté plody pomáhají na astma a latex prýstící z naseknutého kmene slouží k léčbě bradavic. Olej z kořenů je používán pro vnější aplikaci na kožní nemoci, jako je ekzém, lepra a také je vhodný na revma.

Z látek, které fíkovník obsahuje, jsou nejvýznamnější  $\beta$ -sitosteryl-D-glukosid, vitamín K, lanosterol, stigmasterol, lupeol. Dále pak asparagin a tyrozin získávané z plodů fíkovníku. Díky některým těmto látkám působí fíkus i protizánětlivě (10, 11).

### 5.1.3. Heřmáněk bílý (*Lawsonia dermis*)

Heřmáněk bílý, obecně známý jako henna, se používal po staletí v Arabských zemích k barvení vlasů a nehtů a pro dekorativní malování po těle. Henna pochází z jihovýchodní Asie, v současnosti roste planě v severní Africe, jihovýchodní Asii a severní Austrálii.

Pro barvení se používají usušené a namleté listy, které se smíchají s teplou vodou do bahnů podobné konzistence. Barvicí proces je způsoben 2-hydroxy-1,4-naftochinonem (lawson), který je přirozeně přítomen jak v glukosidu, tak v aglykonu v listech rostliny. Obsah lawsonu byl kontrolován a testován pro svou potenciální toxicitu.

Henna se používá po celém světě nejen jako kosmetické činidlo, ale také v tradiční medicíně pro terapii různých chorob jako je zánět, mykóza, kožní vyrážka, bolesti hlavy a nemoci zažívacího ústrojí (12, 13).

### 5.1.4. Heřmáněk pravý (*Matricaria recutita*)

Heřmáněk se hojně vyskytuje v Evropě, západní Asii a Indii. Heřmáněk je snadno zaměnitelný s jinými rody hvězdnicovitých. Lze ho však rozeznat podle jeho charakteristické vůně.

Čaj z heřmánku byl po staletí značně využíván díky své příjemné a uklidňující chuti nebo pro své léčebné účinky. Heřmáněk se používá k léčbě trávicích obtíží i nervových problémů, je součástí protizánětlivých krémů a mastí.

Biologickou zkouškou, prováděnou na květech heřmánku, bylo zjištěno, že mnoho z jeho léčivých účinků, jako je zmírnění bolestivých trávicích potíží,

zánětlivých onemocnění a mírných poruch spánku, velmi souvisí s obsahem jeho fenolické složky, zejména apigeninu a apigeninu 7-O-glukosidu (A7G). U A7G a jeho metabolitu apigeninu bylo prokázáno, že vykazují mimořádné protikřečové, protizánětlivé, antioxidační a protinádorové vlastnosti (14, 15).

#### **5.1.5. Měsíček zahradní (*Calendula officinalis*)**

Měsíček je jednoletá bylina, jejíž původ je nejistý. Nejspíše rostla planě ve středomoří, nyní se pěstuje na všech kontinentech. Typickým znakem měsíčku jsou jeho žluté až oranžové květy.

Měsíček bývá tradičně používán pro své protizánětlivé účinky. U extraktu z měsíčku bylo rovněž zjištěno, že má antioxidační, antimykotické a antidiabetické účinky, zmírňuje otoky a pomáhá při hojení ran.

Hlavními složkami měsíčku jsou steroidy, terpenoidy, triterpenoidy, flavonoidy, fenolové kyseliny a karotenoidy (16, 17).

#### **5.1.6. Náduť zpeřená (*Bryophyllum pinnatum*)**

Náduť je vytrvalá léčivá rostlina populárně užívaná jako lidový lék v tropické Africe, Indii, Číně, Austrálii a Americe a ostatních částech světa k léčení různých zánětlivých onemocnění.

Má důležité uplatnění v ajurvédské a čínské medicíně, neboť obsahuje širokou škálu účinných látek, včetně triterpenoidů, glykosidů, flavonoidů, steroidů, bufadienolidů, lipidů, sacharidů a mastných kyselin.

Listy této rostliny se tradičně používají pro léčbu různých nemocí. Mají hemostatické účinky, dobře hojí rány, dále mají antimikrobiální, protiplísňové, protivředové, protizánětlivé, analgetické, antihypertenzní a silně protialergické účinky (18, 19).

#### **5.1.7. Pampeliška (Smetánka) lékařská (*Taraxacum officinale*)**

Pampeliška je nízká, vytrvalá bylina, která roste v mírném pásu Evropy, Asie a Jižní Ameriky.

Pro léčivé použití slouží zejména listy a kořen pampelišky. Hlavními účinnými látkami v ní obsažené jsou seskviterpenické laktony, vitaminy A, B, C, D, cholin a minerály (např. draslík). Pouze listy navíc obsahují kumariny a karotenoidy. Naproti tomu v kořeni se navíc vyskytují taraxakosidy a fenolové kyseliny.

Pampeliška je tradičně používána pro svou stimulaci vylučování moči (diurézy), pro zvýšení průtoku žluči, zlepšení chuti k jídlu, k léčení trávicích onemocnění. Má i mírně projímavé účinky a stimuluje činnost slinivky a žlučníku (14, 20).

#### **5.1.8. Pelyněk pravý (*Artemisia absinthium*)**

Pelyněk je vytrvalý polokeř s částečně dřevitými stonky, původem pochází z Evropy.

Dnes se tato palčivě hořká bylina používá především pro posílení trávení. Kdysi pelyněk patřil k oblíbeným prostředkům proti parazitickým červům. Tohoto účinku se využívá někdy i dnes. Navíc se z něj vyrábí návykový alkoholický nápoj, absint, oblíbený francouzskou uměleckou avantgardou 19. století. Absint je lihovina se silnou hořkou chutí a charakteristickou zelenou barvou, která v současné době zažívá oživení v popularitě po téměř 70 letech prohibice.

Pelyněk obsahuje štiplavý a výjimečně hořký esenciální olej, který přechází z tmavě zelené do hnědé nebo modré barvy. Jednou z hlavních složek tohoto oleje je bicyklický monoterpen thujon. Přes jeho toxicitu byla tato sloučenina využívána jako indikátor pro posouzení pravosti absintu. Další charakteristické látky v pelyňku jsou seskviterpenové laktony, hořčiny, flavonoidy, třísloviny, hydroxykumariny a další (14, 21).

#### **5.1.9. Rozmarýna lékařská (*Rosmarinus officinalis*)**

Rozmarýna původně rostla pouze v suchých pobřežních oblastech Středomoří, nyní se pěstuje po celém světě pro své využití v kuchyni nebo na výrobu esenciálního oleje.

Rozmarýna lékařská je bohatým zdrojem přírodní fenolické sloučeniny, kyseliny rozmarýnové. Kyselina rozmarýnová je známá pro své protivirové, antibakteriální, protizánětlivé a antioxidační účinky. Navíc bylo u této kyseliny zjištěno, že inhibuje hemoragický účinek hadího jedu a má vliv na Alzheimerovu chorobu. Dalšími

účinnými látkami obsaženými v rozmarýně jsou silice (např. borneol, kamfen, cineol), flavonoidy a trísloviny.

Léčivé účinky rozmarýny jsou především posilující a stimulující, upravuje také trávicí problémy. Rozmarýnový olej se navíc používá proti artritickým bolestem a je i důležitou přísadou kosmetických produktů a parfémů (14, 22).

#### **5.1.10. Sezam indický (*Sesamum indicum*)**

Sezam je jednoletá bylina pěstována zejména v Indii, Číně, Súdánu, Barmě a Mexiku. Indie a Čína jsou však jednoznačně největšími producenty sezamu.

Sezamová semínka a v nich obsažený olej se používaly v Ájurvédě již od starověku. Studie prováděné s využitím moderních metod ukázaly potenciální přínos sezamu pro zdraví. Zjistilo se, že má antioxidační, antihypertonické, protirakovinné, imunoregulační účinky a snižuje hladinu cholesterolu v krvi. Sezam působí i jako projímadlo, pomáhá při urologických a gynekologických infekcích a olej ze semen působí příznivě na cévy a hemeroidy.

Sezamová semena obsahují okolo 45% žlutého sezamového oleje, dále pak rostlinné bílkoviny, fosfor, niacin, vápník, síru a sacharidy. Jeho blahodárné účinky jsou primárně připisovány lignanům a jejich glykosidům. Největšími komponenty lignanů v sezamovém oleji jsou sezamin a sezamolin. Tyto látky vykazují silné antioxidační účinky (23, 24).

#### **5.1.11. Šáchor hlíznatý (*Cyperus rotundus*)**

Šáchor je rozšířený takřka po celém světě, zejména v oblasti tropů a subtropů, některé druhy se však vyskytují i v mírném pásmu.

Šáchor je dobře známý pro své protizánětlivé, analgetické, protiprůjmové a antimalarické účinky. Dále působí na klouby, snižuje horečku, má močopudné účinky, je účinný při ženských obtížích, harmonizuje činnost jater, sleziny a slinivky, pomáhá snižovat hladinu glykémie a také napomáhá při redukci váhy.

Většina těchto účinků je připisována přítomnosti seskviterpenoidů, jež se vyskytují v oddenku rostliny (25, 26).

#### **5.1.12. Vyvinutec kuřímorový (*Evolvulus alsinoides*)**

Vyvinutec kuřímorový je vytrvalá bylina rostoucí převážně v tropech a subtropích.

V Indii dnes patří vyvinutec k populárním rostlinám, se kterými pracuje Ájurvédská medicína. Používá ho jako mozkové tonikum při léčbě neurodegenerativních onemocnění, astmatu a při ztrátě paměti. Bylina se používá též pro léčbu syfilis, malárie, skrofulózy (krtice) a průjmu.

Mezi její hlavní obsahové složky patří alkaloidy, fenoly, steroidy, glykosidy, sacharidy, taniny a terpenoidy (27, 28).

#### **5.1.13. Zázvor lékařský (*Zingiber officinale*)**

Zázvor lékařský je vytrvalá rostlina charakteristická svým dužnatým, článkovaným oddenkem. Pochází z jihovýchodní Asie, nicméně pro svou sladce pikantní chuť se začal pěstovat i ve starověké Indii a Číně. V současné době více než padesát procent jeho produkce pochází z Indie, Brazílie, Jamajky a Nigérie.

Sušený zázvor, nejdůležitější forma v oblasti mezinárodního obchodu, se používá na mezinárodním trhu pro extrakci zázvorového oleje nebo oleoresinu, pro použití do nápojů a cukrovinek.

Zázvor obsahuje množství různých dráždivých látek, které, kromě předávání teplé chuti a kořeněného aroma, poskytují také prokázané farmakologické účinky. 6-gingerol spadá mezi jedny z hlavních látek s největší bioaktivitou, které mají analgetické, protizánětlivé, protirakovinné, antioxidační a znečistlivující účinky. Používá se také na snížení horečky a úpravu srdeční činnosti (29, 30).

#### **5.1.14. Zmijovice hadová (*Rauvolfia serpentina*)**

Zmijovice je keř rostoucí v jižní a jihovýchodní Asii. Tato rostlina se již dlouho používá v indickém subkontinentu jako lék na hadí uštknutí, duševní choroby, hypertenzi a schizofrenii.

Kůra z kořene se rovněž používá na snížení horečky, má protihlístové a sedativní účinky.

Kořeny zmijovice jsou hlavním zdrojem indolových alkaloidů, z nichž je nejvýznamnější reserpin. Reserpin dlouhodobě tlumí centrální nervovou soustavu a má antihypertenzní účinky. Dlouhodobé používání reserpinu může vyvolat deprese a v extrémních případech dotyčného dohnat k sebevraždě. Vyšší dávky reserpinu mohou být toxické (31, 32).

#### **5.1.15. Ženšen pravý (*Panax ginseng*)**

Ženšen je rostlina používaná v tradiční asijské medicíně kvůli jeho léčivým účinkům.

Ženšen je řazen mezi adaptogeny, což je skupina rostlin, která zvyšuje odolnost organismu proti psychickému i fyzickému vyčerpání. Bylo vědecky prokázáno, že ženšen působí na lidský oběhový systém, centrální nervový systém, soustavu žláz s vnitřní sekrecí a imunitní systém. Celosvětově se ženšen užívá ke zvýšení celkové kondice, jako prevence stresu, při únavě, bolestech hlavy, poruchách soustředění a spánku, při cukrovce a velmi oblíben je i jako afrodisiakum.

Mezi nejvýznamnější obsažené látky patří saponiny označované též jako ginsenoidy nebo též panaxosidy, antioxidanty, polysacharidy a peptidy. Ginsenoidy navíc pomáhají při ateroskleróze, zánětech, hypertenzi a poruchách erekce či neplodnosti (33).



**Tabulka č. 2:** Přehled analýzy léčivých rostlin pomocí HPTLC

<i>Rostlina</i>	<i>Stanovovaná složka</i>	<i>Mobilní fáze</i>	<i>Stacionární fáze</i>	<i>Derivatizace</i>	<i>Detekce</i>
Aloe vera gel (9)	Aloeverose	N-butanol: n-propanol: ledová kyselina octová: voda (30:10:10:10)	Silikagel Si 60 F <sub>254</sub>	Anisaldehyd kyseliny sírové (sprejování)	Denzitometrické skenování při 600 nm
Fíkovník posvátný (11)	Stigmasterol, lupeol	Toluen: methanol (9:1)	Silikagel 60 F <sub>254</sub> (20 x 10 cm) TLC hliníková deska	Anisaldehyd kyseliny sírové	Denzitometrické skenování při 525 nm v režimu absorbance pomocí wolframové žárovky
Henovník bílý (13)	Extrakt z henovníkových listů	Ethylacetát: kyselina mravenčí: voda (82:9:9)	Silikagel 60 F <sub>254</sub>	Makrogolové činidlo (polyethylenglykol v dichlormethanu) (máčení)	UVzáření při 365 nm
Heřmánek pravý (15)	Apigenin 7-O- glukosid	Ethylacetát: kyselina mravenčí: kyselina octová: voda (30:1,5:1.5:3)	Silikagel 60 NH <sub>2</sub> F <sub>254S</sub> (20 x 10 cm) HPTLC skleněná deska	Přírodní látky a polyethylenglykol 400 (máčení)	UV záření při 340 nm a 360 nm

Měsíček lékařský (17)	Kyselina chlorogenová, kyselina kávová, rutin, faradiol	Hexan: ethylacetát: kyselina octová	NC silikagel F <sub>254</sub> (10 x 20 cm) HPTLC skleněná deska	10% kyselina sírová ve vodě, nebo 2-aminoethyldifenyl- borát (sprejování)	UV záření při 366 nm, 243 nm nebo bílé světlo před derivatizací
Náduť zpeřená (19)	Stigmasterol	Chloroform: ethanol (9,8:0,2)	Silikagel 60 F <sub>254</sub>	5% kyselina sírová v methanolu (sprejování)	Denzitometrické skenování při 490 nm v režimu odrazu/absorbance
Pampeliška (Smetánka) lékařská (20)	Seskviterpenové laktony	Ethylacetát: kyselina mravenčí: ledová kyselina octová: voda (100:11:11:26)	Silikagel 60 F <sub>254</sub> (20 x 10 cm) hliníkové desky	Anisaldehyd kyseliny sírové nebo vanilin kyseliny sírové (sprejování)	UV záření při 254 nm
Pelyněk pravý (21)	Absinthin	Aceton: kyselina octová (98 %): toluen: dichlormethan (10:10:30:50)	Silikagel 60 F <sub>254</sub> (10 x 10 cm)	Anhydrid kyseliny octové v kyselině sírové a methanolu (10:10:100) (máčení)	VIS při 554 nm

Rozmarýna lékařská (22)	Kyselina rozmarýnová	Toluen: ethylformiát: kyselina mravenčí (6:4:1)	LiChrospher <sup>®</sup> Silikagel 60 F <sub>254</sub> (20 x 10 cm)		UV záření při 254 nm a 366 nm
Sezam indický (24)	Sezamin a sezamolin	Benzen: chloroform (50:1)	Silikagel 60 F <sub>254</sub> (20 x 20 cm) hliníkové desky	5 % kyselina sírová v methanolu (máčení)	UV-VIS spektrum od 200 do 600 nm
Šáchor hlíznatý (26)	Seskviterpenoidy	30% hexan: ethylacetát	Silikagel Kieselgel 60 F <sub>254</sub> (20 x 20 cm)		UV záření v rozmezí 200 a 300 nm
Vyvinutec kuřimorový (28)	Glykosidy	Toluen: methanol (9:1)	Silikagel 60 F <sub>254</sub>	Anisaldehyd kyseliny sírové (sprejování)	UV záření při 254 nm a 366 nm a bílé světlo
	Steroidy	Ethylacetát: ethanol: voda (8:2:1.2)	Silikagel 60 F <sub>254</sub>	Libermann-Buchard čínidlo (anhydrid kyseliny octové v kyselině sírové) (sprejování)	
	Terpenoidy	N-hexan: ethylacetát (7,2:2,9)	Silikagel 60 F <sub>254</sub>	Anisaldehyd kyseliny sírové (sprejování)	

Zázvor lékařský (29)	Gingeroly, 6-shogaol	Hexan: ethylacetát: kyselina mravenčí (55:40:5)	NC. Silikagel 60 F <sub>254</sub> (10 x 10 cm) HPTLC deska	5 % molybdenan amonný v 10 % kyselině sírové nebo p-anisaldehyd v ledové kyselině octové a 97 % kyselině sírové (sprejování)	UV záření při 366 nm a bílé světlo
Zmijovice hadová (32)	Stigmasterol	Benzen: aceton (86:14)	Silikagel 60 F <sub>254</sub> (20 x 10 cm)	Vanilin v 10 % alkoholu kyseliny sírové	Denzitometrické skenování při 366 nm pod rtuťovou lampou
Ženšen pravý (34)	Ginsenoidy	1,2-dichlorethan: 100% ethanol: methanol: voda (56,8:19,2:19,2:4,80)	Silikagel 60 F <sub>254</sub> LiChrospher <sup>®</sup>		UV záření při 275 nm a pod monochromatickým světlem při 366 nm (rtuťová lampa)

## 5.2. Ukázky celého postupu analýzy pomocí HPTLC

Popis celého postupu analýzy léčivých rostlin pomocí HPTLC bude uveden na dvou příkladech.

### 5.2.1. Postup při analýze aloe vera gelu

Richard Lobo a kol. se zabývali stanovením aloeverosy v aloe vera gelu pomocí HPTLC denzitometrické metody (9).

- **Použitý rostlinný materiál**

Byl analyzován aloe vera gel, jehož specifikace (pH, absorbance, obsah vody a mikrobiální zkouška) byla ověřena srovnáním se standardními specifikacemi, které poskytuje firma Agya Enterprises, Biophál, Indie.

- **Příprava standardů**

Byl připraven zásobní roztok aloeverosy o koncentraci 1 mg/ml. Ze zásobního roztoku bylo naředěním vodou připraveno 10 kalibračních roztoků v rozmezí koncentrací 10-100 µg/ml. Takto připravené roztoky byly nanášeny na TLC desku.

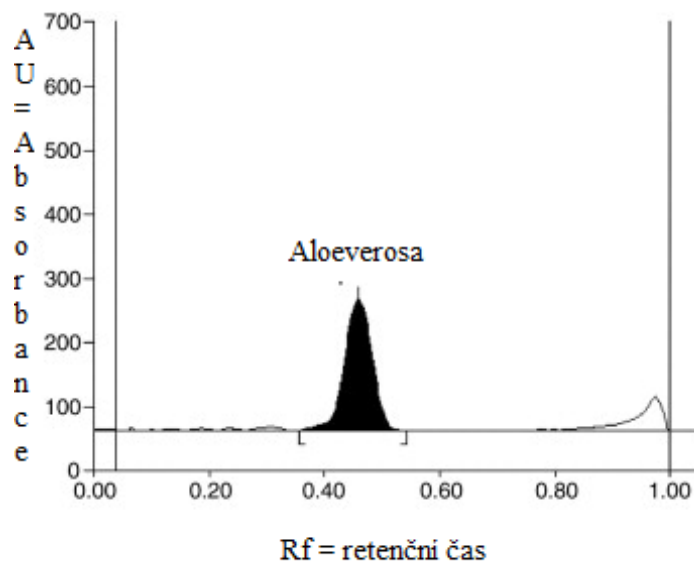
- **Příprava vzorku**

Pro kvantifikaci aloeverosy se použilo 100 mg aloe vera gelu rozpuštěného v 10 ml vody.

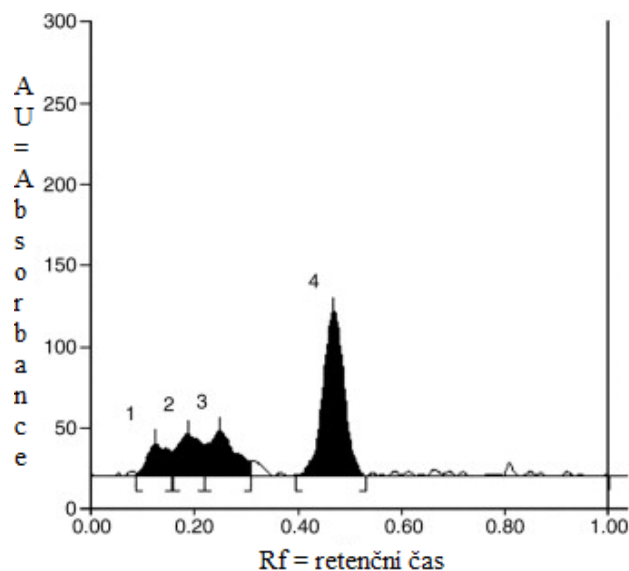
- **HPTLC – fotodenzitometrie**

10 µl připravených kalibračních roztoků bylo nanášeno (proužky o šíři 6 mm) třikrát na TLC desku předem potaženou vrstvou silikagelu Si 60 F<sub>254</sub> (Merck) za použití automatického dávkovače Linomat 5. Mobilní fáze použitá pro vývoj chromatogramu byla složená z n-butanolu, n-propanolu, ledové kyseliny octové a vody v poměru 30:10:10:10. Chromatografie byla provedena v dvouzábkové vyvíjecí komoře. Po vyvinutí byla deska nasprejována anisaldehydem kyseliny sírové a skvrny byly detekovány zahříváním desky na 100 °C po dobu 5 minut. Takto připravené desky byly skenovány při 600 nm tak, aby se zaznamenaly plochy píků.

10  $\mu$ l roztoku vzorku bylo nanášeno na HPTLC desku předem potaženou vrstvou silikagelu Si 60 F<sub>254</sub> za použití automatického dávkovače Linomat 5. Chromatogram byl vyvinut, naskenován a byly zaznamenány plochy píků. Množství aloeverosy ve vzorku bylo spočítáno za pomoci kalibrační křivky standardních roztoků aloeverosy.



**Obr. 16:** Typický HPTLC chromatogram aloeverosy ( $R_f$  0,46) (9).



**Obr. 17:** HPTLC chromatogram aloe vera gelu (9).

- **Výsledky a závěr**

V závěru autoři uvedli, že denzitometrická metoda je jednoduchá a rychlá analytická metoda pro stanovení aloeverosy. Separace složek vzorku gelu a aloeverosy jsou znázorněny na obrázcích 16 a 17. Kalibrační křivka měla rovnici:  $y=785,4x+400,9$  s korelačním koeficientem 0,996.

Datový a HPTLC „fingerprinting“ profil aloeverosy by mohl být využit jako cenný analytický nástroj v rutinní standardizaci aloe vera gelu a produktů z něj vyrobených (9).

### **5.2.2. Postup při analýze vyvinutce kuřímorového**

Duraisamy Gomathi a další členové biochemického ústavu Karpagamské univerzity se podíleli na výzkumu zaměřeném na HPTLC „fingerprinting“ analýzu vyvinutce kuřímorového (28).

- **Sběr rostlinného materiálu**

Celá rostlina vyvinutce použitá k výzkumu byla získána z Tamilnadu v Indii. Čerstvá rostlina byla umyta pod tekoucí vodou, na vzduchu usušena a rozemleta na prášek.

- **Extrakce vzorku**

Vzorek prášku ze sušené rostliny byl extrahován ethanolem ve vodní třepačce po dobu několika dní. Extrakce stejným rozpouštědlem se opakovaly tak dlouho, dokud se nezískal čirý roztok. Získaný extrakt se odpařil do sucha za použití rotační vakuové odparky a posléze byl uskladněn při nízké teplotě v uzavřené nádobě.

- **HPTLC analýza**

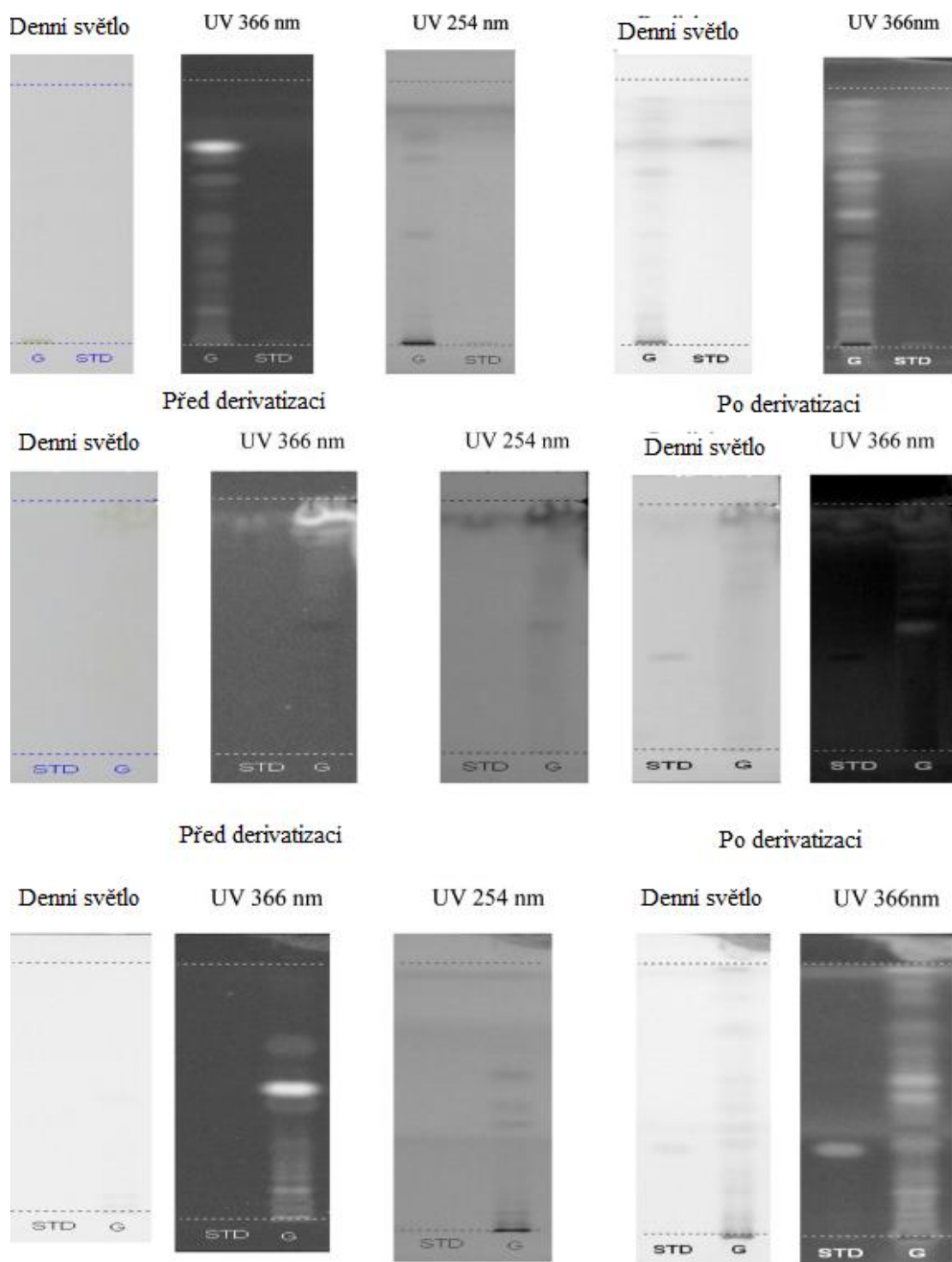
100 mg ethanolového extraktu rostlinného materiálu bylo rozpuštěno v 1 ml ethanolu a centrifugováno. Výsledný roztok byl použit jako testovací roztok pro HPTLC analýzu. 5  $\mu$ l testovacího roztoku a standardního roztoku bylo nanášeno jako proužky za pomoci mikrostříkačky Hamilton Linomat 5 (Camag, Muttenz, Švýcarsko) na silikagelovou 60 F<sub>254</sub> TLC desku. Deska s nanesenými vzorky byla vložena do dvoužlábkové vyvíjecí komory (po saturaci výpary rozpouštědla) s příslušnou mobilní fází (terpenoidy, steroidy a glykosidy). Když mobilní fáze dosáhla

požadované vzdálenosti, deska byla usušena pod horkým vzduchem. Poté byla deska vložena do fotodokumentační komory (Camag, Reprostar 3) a snímky byly zachyceny v bílém světle a UV při 254 nm a 366 nm. Vyvinutá deska byla naspřevována příslušnými činidly (terpenoidy, steroidy a glykosidy) a usušena v horkovzdušné peci. Následně byla deska snímána v denním světle a pod UV při 366 nm za použití fotodokumentační komory. Po derivatizaci byla deska zafixována a skenování se provádělo při 500 nm pomocí TLC skeneru 3. Byl zaznamenán přehled píků, zobrazení píků a denzitogram píků.

- **Detaily analýzy**

- Terpenoidy – mobilní fáze: n-hexan: ethylacetát (7,2:1,2). Derivatizační činidla: anisaldehyd kyseliny sírové. Detekce: po derivatizaci byla pozorována přítomnost modrofialové, narůžověle fialové zbarvené zóny v módu denního světla v daném standardu a vzorku, což potvrzuje přítomnost terpenoidů.
- Glykosidy – mobilní fáze: ethylacetát: ethanol: voda (8:2:1,2). Derivatizační činidla: Libermann- Burchard činidlo. Detekce: po derivatizaci se objevila modrohnědá zóna v módu denního světla v daném standardu a vzorku, což potvrzuje přítomnost glykosidů.
- Steroidy – mobilní fáze: toluen: methanol (9:1). Derivatizační činidla: anisaldehyd kyseliny sírové. Detekce: po derivatizaci byla zpozorována přítomnost modro-fialové zóny v módu denního světla v daném standardu a vzorku, což potvrzuje přítomnost steroidů.





**Obr. 18:** Chromatogramy z HPTLC analýzy. Před derivatizací: pod denním světlem, UV 254 nm a UV 366 nm; po derivatizaci: pod denním světlem a UV 366 nm. První řádek chromatogramů náleží přítomnosti terpenoidů, druhý přítomnosti glykosidů a třetí přítomnosti steroidů ve vyvinutci (28).

- **Výsledky a závěr**

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat metodu HPTLC pro současné stanovení tří biomarkerů, jako jsou terpenoidy, steroidy a glykosidy přítomné ve vyvinutci kuřimorovém. Na obrázku 18 jsou uvedeny jejich chromatogramy z HPTLC analýzy.

Esence těchto metabolitů jsou prospěšné pro udržení zdraví a vhodné pro léčbu chronických degenerativních chorob (28).

## **6. Závěr**

Chromatografie patří bezesporu k nejrozšířenějším analytickým metodám, umožňujícím účinnou separaci látek nutnou pro identifikaci a kvantifikaci složek analyzovaného vzorku. Mezi nejpoužívanější analytické separační techniky používané pro kontrolu kvality hotových bylinných přípravků patří HPLC, HPTLC, GC, často ve spojení s MS.

HPTLC je automatizovaný a instrumentalizovaný stupeň TLC.

TLC je aplikací plošného uspořádání kapalinové chromatografie a kromě mobilní a stacionární využívá i plynné fáze, čímž se liší od ostatních chromatografických technik. Patří k častým chromatografickým metodám, nevyžaduje žádné speciální předzpracování vzorků, a proto se hojně využívá v analýze kosmetických a rostlinných materiálů, dále ve farmaceutickém průmyslu, analýze potravin a vzorků z environmentálního prostředí.

HPTLC má na rozdíl od TLC vyšší separační účinnost, umožňuje manipulaci velkého množství vzorků, rychlejší separaci, vyšší citlivost a lepší reprodukovatelnost. HPTLC lze využít pro důkaz a identifikaci obsažených látek, dále pro ověřování čistoty látek, pro preparativní účely, pro rychlou a kvantitativní analýzu.

Základní souprava pro HPTLC analýzu může zahrnovat například Nanomat 4 nebo kapilární dávkovač, dvoužlábkovou vyvíjecí komoru, zařízení SmartALERT nebo automatickou vyvíjecí komoru, TLC/ HPTLC postřikovač a UV kabinet s UV lampou 254/ 366 nm (Camag, Muttenz, Švýcarsko).

HPTLC je tedy propracovaná přístrojová technika, která poskytuje vynikající separační, kvalitativní a kvantitativní analýzu široké škály sloučenin vyskytujících se např. v rostlinách a rostlinných potravinových doplňcích tradiční čínské a indické medicíny. Srovnávací studie často zjistily, že HPTLC je lepší než HPLC z hlediska celkových nákladů a času potřebného k analýze. Moderní technika HPTLC v kombinaci s automatizovanou aplikací vzorků a denzitometrickým skenováním je cenným nástrojem pro spolehlivou identifikaci, neboť poskytuje chromatografické „fingerprinting“, které mohou být zobrazeny a uloženy jako elektronické obrazy. Stejně jako u člověka otisk prstu (z angličtiny fingerprint) slouží chromatografický „fingerprinting“ u rostlin k jejich ověření a identifikaci. Tato chromatografická „fingerprinting“ analýza bylinných léčivých přípravků představuje komplexní kvalitativní přístup za účelem ověřování druhů, vyhodnocení kvality, udržení konzistence a stability bylinných léků a jejich souvisejících produktů.

## 7. Seznam zdrojů

- (1) CAMAG CHEMIE-ERZEUGNISSE & ADSORPTIONSTECHNIK AG. *INSTRUMENTS, TOOLS AND CONCEPTS FOR HPTLC* [online]. 2014 [cit. 2014-11-04]. Dostupné z: <http://www.camag.com/en/home.cfm>
- (2) MANMOHAN S., Editor. *High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)*. Heidelberg: Springer, 2011. ISBN 978-364-2140-242.
- (3) KARLÍČEK R. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 4., nezměn. vyd. Praha: Karolinum, 2013, 281 s. ISBN 978-80-246-2202-6.
- (4) LÁBLER L. a SCHWARZ V. *Chromatografie na tenké vrstvě*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1965, 465 s.
- (5) SOBOTNÍKOVÁ J. *Separční metody*. In: [www.natur.cuni.cz/~suchan](http://www.natur.cuni.cz/~suchan) [online]. 2014, 19. února 2014 [cit. 2014-11-04]. Dostupné z: [http://web.natur.cuni.cz/~suchan/PC\\_TLC.pdf](http://web.natur.cuni.cz/~suchan/PC_TLC.pdf)
- (6) VÁVROVÁ J. *Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie*. [online]. [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200630/hypertext/AJAOI.htm>
- (7) BIMAL N. a SEKHON B. S. *High Performance Thin layer Chromatography: Application in Pharmaceutical Science*. *PhTechMed* [online]. 2013, vol. 2, issue 4 [cit. 2015-04-02]. Dostupné z: <http://www.pharmtechmedica.com/upload/High%20Performance%20Thin%20layer%20Chromatography%20Application%20in%20Pharmaceutical%20Science.pdf>
- (8) PATEL D. K., PATEL K. a DHANABAL SP. *Phytochemical standardization of Aloe vera extract by HPTLC techniques*. *Journal of Acute Disease* [online]. 2012, vol. 1, issue 1, s. 47-50 [cit. 2015-03-20]. DOI: 10.1016/s2221-6189(13)60011-6.
- (9) LOBO R., PRABHU K. S., SHIRWAIKAR A., BALLAL M., BALACHANDRAN C. a SHIRWAIKAR A. *A HPTLC densitometric method for the determination of aloeverose in Aloe vera gel*. *Fitoterapia* [online]. 2010, vol. 81, issue 4, s. 231-233 [cit. 2015-03-20]. DOI: 10.1016/j.fitote.2009.09.001.
- (10) SVOBODOVÁ V. *FICUS RELIGIOSA L. – fíkovník posvátný*. HOSKOVEC, Ladislav. *BOTANY.cz* [online]. 2014 [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/ficus-religiosa/>

- (11) RATHEE D., RATHEE S., RATHEE P., DEEP A., ANANDJIWALA S. a RATHEE D. HPTLC densitometric quantification of stigmasterol and lupeol from *Ficus religiosa*. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2011, s. - [cit. 2015-03-30]. DOI: 10.1016/j.arabjc.2011.01.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535211000256>
- (12) JELÍNKOVÁ I. *Atlas květin: alkana pravá, hena, henna* [online]. [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.atlasbotani.eu/index.php?detail&cislo=1341>
- (13) GALLO F. R., MULTARI G., GIAMBENEDETTI M. a FEDERICI E. Chemical fingerprinting of *Lawsonia inermis* L. using HPLC, HPTLC and densitometry. *Phytochemical Analysis* [online]. 2008, vol. 19, issue 6, s. 550-559 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1002/pca.1084. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pca.1084>
- (14) CURTIS S. *Domácí bylinář: příprav, uvař a smíchej léčivé bylinky*. Vyd. 1. Praha: Ikar, 2012, 352 s. ISBN 978-80-249-1809-9.
- (15) GUZELMERIC E., VOVK I. a YESILADA E. Development and validation of an HPTLC method for apigenin 7-O-glucoside in chamomile flowers and its application for fingerprint discrimination of chamomile-like materials. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2015, vol. 107, s. 108-118 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.12.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073170851400627X>
- (16) HOSKOVEC L. CALENDULA OFFICINALIS L. – měsíček lékařský / nechtík lékařský. HOSKOVEC, Ladislav. *BOTANY.cz* [online]. 2007 [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/calendula-officinalis/>
- (17) LOESCHER Ch. M., MORTON D. W., RAZIC S. a AGATONOVIC-KUSTRIN S. High performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the qualitative and quantitative analysis of *Calendula officinalis*—Advantages and limitations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2014, vol. 98, s. 52-59 [cit. 2015-03-20]. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.04.023.
- (18) SVOBODOVÁ V. BRYOPHYLLUM PINNATUM (Lam.) Oken – náduť. HOSKOVEC, Ladislav. *BOTANY.cz* [online]. 2013 [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/bryophyllum-pinnatum/>
- (19) KAMBOJ A. a SALUJA A. K. Development of validated HPTLC method for quantification of stigmasterol from leaf and stem of *Bryophyllum*

- pinnatum. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2013, s. - [cit. 2015-03-30]. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.10.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535213003468>
- (20) CORTÉS N, MORA C., MUÑOZ K., DÍAZ J., SERNA R., CASTRO D. a OSORIO E. Microscopical descriptions and chemical analysis by HPTLC of *Taraxacum officinale* in comparison to *Hypochaeris radicata*: a solution for mis-identification. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. 2014, Volume 24, Issue 4, Pages 381–388 [cit. 2015-03-20]. DOI: 10.1016/j.bjp.2014.07.018. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X14000520>
- (21) LACHENMEIER D. W. Assessing the authenticity of absinthe using sensory evaluation and HPTLC analysis of the bitter principle absinthin. *Food Research International* [online]. 2007, vol. 40, issue 1, s. 167-175 [cit. 2015-03-21]. DOI: 10.1016/j.foodres.2006.09.002.
- (22) CORAN S. A., MULAS S. a MULINACCI N. Crucial aspects of high performance thin layer chromatography quantitative validation. The case of determination of rosmarinic acid in different matrices. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, vol. 1220, s. 156-161 [cit. 2015-03-21]. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.11.040.
- (23) *Sesamum indicum* - Sezam indický. *Herbář Wendys* [online]. [cit. 2015-03-27]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/kytky/K393.php>
- (24) SUKUMAR D., ARIMBOOR R. a ARUMUGHAN C. HPTLC fingerprinting and quantification of lignans as markers in sesame oil and its polyherbal formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2008, vol. 47, 4-5, s. 795-801 [cit. 2015-03-27]. DOI: 10.1016/j.jpba.2008.03.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708508001726>
- (25) Šáchor hlíznatý. *EHerbář* [online]. 2015 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://e-herbar.info/index.php/neduhy-nemoci/slinivka/39-s1/135-sachor-hliznaty>
- (26) PRIYA RANI M. a PADMAKUMARI K. P. HPTLC and reverse phase HPLC methods for the simultaneous quantification and in vitro screening of antioxidant potential of isolated sesquiterpenoids from the rhizomes of *Cyperus rotundus*. *Journal of Chromatography B* [online]. 2012, vol. 904, s. 22-28 [cit. 2015-04-01]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.05.042. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023212003340>

- (27) GRULICH V. EVOLVULUS ALSINOIDES (L.) L. – vyvinutec. *BOTANY.cz* [online]. 2011 [cit. 2015-03-27]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/evolvulus-alsinoides/>
- (28) GOMATHI D., RAVIKUMAR G., KALAISELVI M., VIDYA B. a UMA Ch. HPTLC fingerprinting analysis of *Evolvulus alsinoides* (L.) L. *Journal of Acute Medicine* [online]. 2012, vol. 2, issue 3, s. 77-82 [cit. 2015-03-27]. DOI: 10.1016/j.jacme.2012.08.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211558712000568>
- (29) SALMON C. N. A., BAILEY-SHAW Y. A., HIBBERT S., GREEN Ch., SMITH A. M. a WILLIAMS L. A. D. Characterisation of cultivars of Jamaican ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by HPTLC and HPLC. *Food Chemistry* [online]. 2012, vol. 131, issue 4, s. 1517-1522 [cit. 2015-03-17]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.09.115. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611013926>
- (30) *Zingiber officinale* / zázvor lékařský. *Avicenna Company, spol. s. r. o.: Herbální přípravky* [online]. [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.avicenna.cz/item/zingiber-officinale-zazvor-lekarsky>
- (31) Dvouděložné rostliny. *Naturstoff* [online]. [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/naturstoff/biologie/bi-2d-29-tojkle.html>
- (32) DEY A. a PANDEY D. K. HPTLC detection of altitudinal variation of the potential antivenin stigmasterol in different populations of the tropical ethnic antidote *Rauvolfia serpentina*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* [online]. 2014, vol. 7, S540-S545 [cit. 2015-03-28]. DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60287-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S199576451460287X>
- (33) ARNDT T. Ženšen - tisíciletý zázrak čínských císařů. *CELOSTNIMEDICINA.CZ: Informační server o zdraví* [online]. 2015 [cit. 2015-03-28]. Dostupné z: <http://www.celostnimedicina.cz/zensen-tisicilety-zazrak-cinskych-cisaruu.htm>
- (34) VANHAELEN-FASTRÉ R. J., FAES M. L. a VANHAELEN M. H. High-performance thin-layer chromatographic determination of six major ginsenosides in *Panax ginseng*. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, vol. 868, issue 2, s. 269-276 [cit. 2015-04-01]. DOI: 10.1016/s0021-9673(99)01253-4.