

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA FARMAKOGNOZIE**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Antiradikálová aktivita přírodních látek I.**

Vypracovala: Magdalena Relovská  
Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jiřina Spilková, CSc.  
Oponent: PharmDr. Marie Kašparová, Ph.D.  
Datum zadání: 29. 10. 2004  
Datum odevzdání: 15. 5. 2006  
Datum obhajoby: 6. 6. 2006

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

V Hradci Králové 15. 5. 2006

*Telesca'*  
.....

Děkuji Doc. RNDr. Jiřině Spilkové, CSc. za odborné vedení a pomoc při řešení této diplomové práce. Děkuji také slečně Mgr. Vendule Vrchovské a paní laborantce Boženě Stružkové.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
4.1	VOLNÉ RADIKÁLY .....	8
4.2	VOLNÉ RADIKÁLY A NEMOCI .....	10
4.3	ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA.....	12
4.4	<i>HYPERICUM PERFORATUM L. (HYPERICACEAE)</i> .....	19
4.4.1	<i>Biologická aktivita HYPERICUM PERFORATUM</i> .....	19
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>26</b>
5.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	26
5.2	ANALYZOVANÝ MATERIÁL.....	27
5.3	STANOVENÍ OBSAHU FLAVONOIDŮ .....	27
5.4	STANOVENÍ OBSAHU HYPERICINU.....	28
5.5	STANOVENÍ ZTRÁTY SUŠENÍM .....	29
5.6	STANOVENÍ ZBYTKU PO VYSUŠENÍ EXTRAKTU .....	30
5.7	STANOVENÍ ANTIRADIKÁLOVÉ AKTIVITY .....	31
5.7.1	<i>Příprava roztoku DPPH</i> .....	31
5.7.2	<i>Příprava methanolového extraktu z drogy</i> .....	31
5.7.3	<i>Příprava vodného extraktu z drogy</i> .....	31
5.7.4	<i>Stanovení antiradikálové aktivity extraktů</i> .....	31
5.7.5	<i>Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu po semipreparativní TLC</i> .....	32
5.8	DŮKAZ OBSAHOVÝCH LÁTEK <i>HYPERICI HERBA</i> POMOCÍ TLC .....	33
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>34</b>
6.1	TABULKOVÁ ČÁST .....	34
6.1.1	<i>Stanovení obsahu flavonoidů</i> .....	34
6.1.2	<i>Stanovení obsahu hypericinu</i> .....	35
6.1.3	<i>Ztráta sušením</i> .....	35
6.1.4	<i>Zbytek po odpaření extraktů</i> .....	36
6.1.5	<i>Stanovení antiradikálové aktivity</i> .....	37
6.1.6	<i>Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu</i> .....	49
6.2	GRAFICKÉ ZNÁZORNĚNÍ .....	57
6.3	TLC .....	62
<b>7</b>	<b>DISKUSE</b> .....	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>68</b>

# 1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	antioxidační (antiradikálová) aktivita
AUC	plocha pod křivkou (farmakokinetická charakteristika)
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
HP	<i>Hypericum perforatum</i>
NO	oxid dusnatý
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
VR	volné radikály

## 2 ÚVOD

Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*, HP) je léčivá rostlina, o které se v poslední době hodně mluví. Má mnoho léčivých účinků, díky nimž je široce využívána. Nejvíce jsou studovány její antidepresivní účinky. Je součástí jak HVLP, tak mnoha dalších fytofarmak a potravních doplňků s uklidňujícími účinky. Ale není to zdaleka její jediná indikace.

V poslední době s mohutným rozvojem tzv. „civilizačních onemocnění“, které se přiřazují nadměrnému stresu, nevhodné stravě, nedostatku pohybu, nadváze a celkově nezdravému životnímu stylu, se začíná mluvit o antioxidantech, které by člověka mohly chránit před rozvojem aterosklerózy a s tím souvisejícími komplikacemi, ale i neurodegenerativními chorobami, rakovinou a dalšími nemocemi.

Kromě mnoha syntetických antioxidantů, vitamínů a minerálů se využívají i antioxidační účinky některých rostlin.

Stále více narůstá zájem o polyfenoly, a to z několika důvodů. Obecně jsou přiřazovány k antioxidantům (jedná se o nejhojnější antioxidanty v rostlinách i naší stravě), mohou chránit před různými nemocemi, které mají určitý vztah k oxidačnímu stresu. (1)

Nejběžnějšími rostlinnými polyfenoly jsou flavonoidy, fenolické kyseliny a lignany. (2) Předpokládá se, že flavonoidy mají prospěšné účinky díky jejich antioxidačním vlastnostem a právě antikarcinogenní, antimutagenní, neuroprotektivní a kardioprotektivní účinky jsou všeobecně spojovány s antioxidačními vlastnostmi flavonoidů. (3, 4, 5, 6)

Základní struktura flavonoidů obsahuje flavanové jádro, které je složeno z 15ti atomů uhlíku spojených ve třech kruzích (C6-C3-C6) označených jako kruhy A, B, C. (3, 7) Skupiny flavonoidů se liší ve stupni oxidace a nasycení kruhu C, zatímco jednotlivé sloučeniny v rámci jedné skupiny se liší substitucemi kruhu A a B. Kromě flavanu, kde je chroman arylovaný v poloze 2, se v rostlinách ještě vyskytují isoflavany arylované v poloze 3 a v menší míře neoflavany arylované v poloze 4.

Kromě základní struktury, od které jsou flavonoidy odvozeny, hraje důležitou roli v síle antioxidační aktivity i počet a pozice hydroxylových skupin,

glykosylace a jiná substituce. Ukázalo se, že ke zvýšení AA přispívá o-dihydroxystruktura v kruhu B (catecholové seskupení), 3-hydroxyskupina na chromanovém seskupení a dvojná vazba mezi polohami 2 a 3 v kruhu C. (8, 9, 10) Určitý význam pro antioxidační aktivitu má i 3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-on seskupení. (4)

Glykosylované flavonoidy vykazují menší antioxidační potenciál než jejich samotné aglykony (8), ale právě 3',4'-catecholová struktura u glykosylované formy pozoruhodně zvyšuje antioxidační sílu, kdežto o-methylace antioxidační aktivitu snižuje. (11)

HP má široké spektrum obsahových látek, které jsou zodpovědné za různé účinky. Obsahuje mimo jiné i flavonoidy a ty jsou nejspíše zodpovědné za její antioxidační aktivitu.

### **3 CÍL PRÁCE**

Cílem této práce bylo stanovit antiradikálovou aktivitu dvou vzorků *Hypericum perforatum* s použitím dvou různých rozpouštědel (methanol a voda). AA byla stanovena spektrofotometricky metodou využívající DPPH radikál.

## 4 TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1 VOLNÉ RADIKÁLY

Volné radikály (VR) byly dlouho považovány za fragmenty molekul existující téměř neměřitelnou dobu jako součást mechanismů chemických reakcí. (12)

Jádro atomu složené z kladných protonů a neutrálních neutronů je obklopeno negativními elektrony. Atomy se chemickými vazbami spojují v molekuly. V neutrálním atomu či molekule je počet protonů a elektronů vyrovnaný. Pokud v atomu či molekule není stejný počet protonů a elektronů, částice se nazývá ion. Elektrony zaujímají v atomech a molekulách definované prostory, tj. energetické hladiny, slupky, zvané orbitaly. Každý orbital může obsahovat maximálně dva elektrony a ty musí mít opačný spin. Pokud atom nebo molekula (ať už neutrální nebo ion) obsahuje alespoň jeden orbital s jedním, tedy nepárovým elektronem, částice se nazývá volný radikál. (12) Volné radikály vznikají z normální částice ztrátou či přijetím elektronu. Ztráta elektronu je z elektrochemického hlediska oxidace a volné radikály mají oxidační účinky. Protože stabilní konfigurace vyžaduje párové seskupení elektronů, snaží se volné radikály chybějící elektron doplnit. Z toho plyne malá stabilita a vysoká reaktivita volných radikálů. (13) Vznik radikálu může být iniciací celého řetězce dalších reakcí, (12) které mohou být pro náš organismus velmi nebezpečné. (14)

Volné radikály se dostávají do organismu zvenčí, velké množství však vzniká i v průběhu metabolismu. (13)

Kromě množství negativních účinků a důsledků působení volných radikálů nesmíme zapomenout na to, že tyto subjekty mají, byť omezené, pozitivní účinky. Například reaktivní formy kyslíku a dusíku slouží jako účinná zbraň fagocytů proti bakteriím a cizím strukturám. (12) Hydroxylový radikál, vzniklý v dýchacím řetězci, je využíván například při biosyntéze cholesterolu a žlučových kyselin nebo při detoxikaci některých xenobiotik. Spermie vyžaduje k úspěšnému oplodnění vajíčka superoxid a peroxid vodíku. Superoxid je třeba k narušení membrány vajíčka,



peroxid vodíku je vytvářen vajíčkem po oplodnění a zajišťuje tvorbu křížových vazeb mezi molekulami tyrosinu v membráně vajíčka, což zabraňuje pronikání dalších spermií. Peroxid vodíku je nezbytný pro oxidaci jodidu na elementární jod, který je štítnou žlázou využit k jodaci aromatických jader tyroninu. Příznivý účinek má i oxid dusnatý, který je rovněž radikálem a má výrazný vazodilatační efekt. Jiné volné radikály působí jako signální molekuly. (13)

V posledních letech bylo získáno mnoho dokladů o tom, že v organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) a reaktivních forem dusíku (reactive nitrogen species – RNS), a že tyto látky mají značný fyziologický i patogenetický význam. Jsou významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však působí jako toxické látky a jako desinformační agenti, schopní organismus poškodit a dokonce ho i usmrtit. (12) Reaktivní formy kyslíku ROS jsou spjaty s počátkem, nebo mohou doprovázet či být příčinou patogeneze mnoha nemocí. Jsou určité důkazy, že abnormality u lipidových sloučenin mohou zapříčinit nadprodukcí ROS. (15) ROS jsou zapojeny v rozvoji různých nemocí zahrnujících buněčné stárnutí, mutagenezi, karcinogenezi, kardiovaskulární nemoci, diabetes mellitus, neurodegenerativní choroby (16) a revmatické choroby. (17) ROS jsou vytvářeny mnoha redoxními procesy, které se normálně vyskytují v metabolismu aerobních buněk. Pokud ROS nejsou eliminovány, mohou ničit důležité molekuly, jako jsou proteiny, DNA a lipidy. (17)

Některé z reaktivních forem kyslíku jako volné radikály jsou superoxid ( $O_2^{\cdot}$ ), hydroxylový radikál ( $HO^{\cdot}$ ), peroxy ( $ROO^{\cdot}$ ), alkoxy ( $RO^{\cdot}$ ), hydroxyperoxy ( $HO_2^{\cdot}$ ) a některé z reaktivních forem dusíku jako volné radikály jsou oxid dusnatý ( $NO^{\cdot}$ ) a oxid dusičitý ( $NO_2^{\cdot}$ ) (12)

## 4.2 VOLNÉ RADIKÁLY A NEMOCI

Volné radikály se podílejí na vzniku a rozvoji četných onemocnění a chorobných stavů. Někdy volné radikály vyvolávají přímo vznik onemocnění, jindy zhoršují či komplikují jeho průběh. (13)

### 4.2.1.1.1 *Ateroskleróza*

Cholesterol a jiné tuky (lipidy) jsou transportovány po celém těle krví, a to ve formě drobných částecek, které se nazývají lipoproteiny. (14)

Podle současných poznatků je na počátku aterosklerotického procesu oxidace lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) volnými radikály. (13) Dochází k lipoperoxidaci a glykooxidaci, kdy vznikají modifikované částice LDL. Ty se váží na scavengerové receptory makrofágů za vzniku pěnových buněk s cholesterolem a ty se ukládají v cévní stěně pod endotelem ve formě lipidových proužků.

Volné radikály se uplatňují nejen při vzniku a rozvoji aterosklerózy, ale i při jejích komplikacích. (13)

### 4.2.1.1.2 *Diabetes mellitus*

Volné radikály se uplatňují při vzniku diabetu i při rozvoji jeho pozdních komplikací. (13) Diabetes mellitus je vždy provázen oxidačním stresem, tj. převahou oxidačních reakcí nad antioxidační ochranou tkání. V krvi a tkáních nemocných je prokazatelně vyšší tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) a lipoperoxidů a současně snížené hladiny antioxidačně působících látek a antioxidačních enzymů. (12)

### 4.2.1.1.3 *Plicní onemocnění*

Plíce jsou jediným vnitřním orgánem, který je v přímém kontaktu se zevním prostředím plochou přibližně 100 m<sup>2</sup>. Obrovská kontaktní plocha činí dýchací ústrojí velmi citlivým ke kyslíku a ke všem škodlivinám zevního prostředí (cigaretový kouř, oxidy síry a dusíku, ozón, azbest, křemík, oxid křemičitý, paraguat). Tyto látky jsou radikály nebo reagenty, které mohou ve tkáni indukovat tvorbu reaktivních forem kyslíku. ROS poškodí biomolekuly plicní tkáně, zejména membránové lipidy, poškodí endotelové buňky a ovlivní regulační buněčné mechanismy. (12)

#### **4.2.1.1.4 Onemocnění gastrointestinálního traktu**

Experimentální a klinické práce v průběhu 80. a 90. let minulého století přinesly důkazy pro významné postavení reaktivních forem kyslíku ROS v patogenezi řady onemocnění trávicího ústrojí. (12)

S tímto jevem se můžeme setkat u idiopatických střevních zánětů jako je ulcerózní kolitida a Crohnova choroba, dále při gastropatiích vyvolaných nesteroidními antiflogistiky, ale i při slizničních lézích žaludku a duodena u infekce *Helicobacter pylori*.

#### **4.2.1.1.5 Poškození jater**

Zvýšená tvorba volných radikálů v játrech většinou souvisí s metabolismem xenobiotik, s akumulací železa a mědi a také s reperfuzí po ischemii. Je příčinou řady jaterních onemocnění. (12)

#### **4.2.1.1.6 Akutní a chronická pankreatitida**

Reaktivní formy kyslíku se při akutní pankreatidě tvoří stejně intenzivně jako při jiných zánětlivých onemocněních. Jejich převaha nad antioxidační ochranou tkáně se objevuje zejména na počátku onemocnění a předchází plnému rozvoji morfologického obrazu. Zdroj zvýšené produkce i jejich specifický význam v patogenezi onemocnění zůstává neobjasněn. ROS se ve zvýšené míře tvoří i u chronické pankreatitidy, kdy se mohou uplatnit pro nedostatek přirozených antioxidantů. (12)

#### **4.2.1.1.7 Renální nemoci**

Zánětlivá onemocnění ledvin jsou spojena s infiltrací ledvin neutrofily a makrofágy, které jsou schopny produkovat velká množství reaktivních forem kyslíku a dusíku. (12)

#### **4.2.1.1.8 Neurodegenerativní choroby**

Centrální nervový systém má malou antioxidační kapacitu a velké množství lipidové tkáně, která může být volnými radikály poškozena. (13) Nejčastějšími onemocněními tohoto typu je Parkinsonova a Alzheimerova choroba.

### 4.3 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

Antioxidační ochrana organismu představuje složitý komplex mechanismů, které pracují ve vzájemné souhře, doplňují se a mnohdy i potencují, navíc musí být v rovnováze s prooxidačními látkami, tedy s produkcí volných radikálů. (13) Funkce jednoho antioxidantu velmi často podmiňuje účinek jiného článku soustavy. (12)

Nejbezpečnějším způsobem je bránit se tvorbě nadměrného množství reaktivních forem kyslíku a dusíku. Druhou možností je záchyt a odstranění radikálů, které se již vytvořily. V literatuře se tyto látky označují jako vychytávače či zametače, lapače a zhášeče. Na antioxidační ochraně se podílejí též obecné reparační mechanismy poškozených biomolekul. (12)

Buňky si vytvářejí důležité a ochranné mechanismy obsahující antioxidační enzymy a neenzymatické sloučeniny, které je pomáhají chránit před destruktivním efektem ROS. (17)

Antioxidant, inhibitor oxidace molekul, je velmi důležitý pro obranu proti oxidativnímu stresu u žijících systémů. Oxidace biomolekul se obvykle děje mechanismem autooxidace, která zahrnuje radikálovou řetězovou reakci peroxylového radikálu biomolekuly. Je dobře známo, že silný a účinný antioxidant má jednoznačnou schopnost zhášení peroxylového radikálu pomocí poskytnutí svého atomu vodíku radikálovým formám. (18)

Nejen nadměrná produkce ROS a RNS, ale i porušení rovnováhy složek antioxidační soustavy může být buď primární příčinou základních patologických stavů, nebo může mít za následek zhoršení chorobných stavů vyvolaných jinou příčinou než radikálovými reakcemi. Porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním ROS a RNS se nazývá oxidační stres. (12)

Antioxidanty tvoří různorodou skupinu látek. (13) Antioxidanty můžeme dělit podle následujících hledisek:

- 1) Podle ovlivnění tvorby volných radikálů
  - a) primární (brání vzniku VR)
  - b) sekundární (likvidují již vzniklé VR)
  - c) terciární (opravují či eliminují molekuly poškozené působením VR)
  
- 2) Podle původu (způsobu vstupu do organismu)
  - a) endogenní (tvoří se v organismu)
  - b) exogenní (přicházejí zvenčí)
    - přirozené (např. vitamíny)
    - umělé
  
- 3) Podle rozpustnosti ve vodě či v tucích
  - a) hydrofilní (rozpustné ve vodě)
  - b) lipofilní (hydrofobní, rozpustné v tucích)
  - c) amfifilní (spojují vlastnosti obou předcházejících skupin)
  
- 4) Podle lokalizace v buňce či mimo buňku
  - a) extracelulární
  - b) intracelulární (jejich význam pro ochranu před VR je rozhodující)
  
- 5) Podle velikosti molekuly
  - a) vysokomolekulární (bílkoviny); zvláštní místo mezi nimi mají enzymy, které se podílejí zejména na intracelulární antioxidantní ochraně
  - b) nízkomolekulární

- 6) Podle mechanismu účinku
- a) katalyzátory
  - b) chelatační látky
  - c) inhibitory enzymů
  - d) ostatní
- 7) Podle typu volného radikálu (resp. ROS), na který působí – antioxidanty likvidující:
- a) superoxid
  - b) hydroxylový radikál
  - c) singletový kyslík
  - d) peroxid vodíku
  - e) oxid dusnatý
  - f) kyselinu chlornou (13)

Je mnoho metod, kterými lze stanovit antioxidační aktivitu. V poslední době se více a více zvyšuje zájem o antioxidanty a také vzrůstá zájem stanovit antioxidační aktivitu u přírodních látek. Využívá se buď testování reaktivity jednotlivých izolovaných látek proti volným radikálům, ale jelikož obrovská část přírodních antioxidantů je složitá směsice látek, proto se také z velké části sleduje a charakterizuje antioxidační aktivita směsných vzorků jako celku.

Přestože hodnocení antioxidačních vlastností přírodních látek je v oblasti výzkumu věnována široká pozornost, je třeba připomenout, že řada látek přijímaných v rostlinném materiálu podléhá metabolickým změnám již v trávicím traktu a jejich účinek v organismu je dále podstatně ovlivněn mírou resorpce a dalším metabolismem. Proto výrazná antioxidační aktivita zjištěná *in vitro* nemusí znamenat adekvátně významný účinek *in vivo*. (19)

V literatuře lze nalézt velký počet metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity. Nejčastěji jde o přímou reakci s radikály nebo reakci s přechodnými kovy. (19) Podle toho jsou tyto metody rozděleny na dvě odlišné skupiny, a to metody hodnotící schopnost eliminovat volné radikály a metody posuzující redoxní vlastnosti látek.

Metody založené na eliminaci radikálu spočívají v hodnocení schopnosti vzorku vychytávat volné radikály, které mohou být v reakční směsi generovány, nebo jsou do ní přidávány. Radikály jsou z chemického hlediska posuzovány jako syntetické stabilní radikály nebo radikály kyslíkové. Mezi metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek patří metody chemické a elektrochemické.

#### 1) Metody založené na eliminaci radikálů

##### a) Metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů

- Metoda používající ABTS (metoda TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (20))
  - Je jednou ze základních a nejpoužívanějších metod pro stanovení antioxidační aktivity. Testuje schopnost vzorku zhaset kation-radikál  $ABTS^{\cdot+}$  (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)) (19) převedením na bezbarvý produkt (21). Výsledná antiradikálová aktivita je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Trolox a je sledována spektrofotometricky.
  - Metoda je často používána pro interpretaci vztahu struktury a aktivity (SARs). Pokusy ale ukazují, že TEAC vyjadřuje antioxidační kapacitu parentní látky plus potenciální antioxidační kapacity reakčního/ních produktu/ů. To znamená, že tato metoda nereflektuje nutně antioxidační účinek pouze jedné struktury, což může vadit při aplikaci metody na SARs. (21)
- Metoda používající DPPH
  - Je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. (19) Zhasení DPPH-radikálu je jednoduchá modelová reakce poskytující relevantní informaci o schopnosti kyselin zhaset volné hydroxylové

radikály. (22) Podstatou je reakce testované látky se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl), kdy dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Reakce je také nejčastěji sledována spektrofotometricky. DPPH obsahuje lichý nepárový elektron a dává silnou absorpci při vlnové délce 518 nm. Pokud se tento elektron stane párovým v přítomnosti zhášeče volného radikálu, absorpce klesá a výsledné odbarvení je stechiometrické ve vztahu k počtu přidávaných elektronů. (23)

- Metoda používající galvinoxyl
  - Dochází k redukci stabilního radikálu galvinoxylu a reakce se sleduje spektrofotometricky.
  
- Využití jiných stabilních radikálů
  - Pro hodnocení schopnosti látek poskytovat vodíkový atom nebo elektron se používá také syntetický volný radikál Fremyho sůl (nitrosodisulfonan draselný), detekce a hodnocení reakce se provádí pomocí ESR (elektronová spinová rezonance). (19)
  - Mezi důležité stabilní syntetické radikály patří například i dimethyl-p-fenylendiamindihydrochlorid (24)

#### b) Metody hodnotící eliminaci kyslíkových radikálů

- Metoda ORAC (oxygen radical absorbance capacity)
  - V testovaném systému se generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci (19)



- Metody založené na vychytávání OH-radikálů
  - Při těchto metodách jsou OH-radikály generovány různými postupy. Detekce je založena na vychytávání radikálu látkami, jejichž reakční produkty lze snadno stanovit. (19)
  - Příkladem může být Fentonova metoda. Tato metoda detekuje antioxidanty klasifikované jako terminátory volných radikálů, které mohou kompetovat s kyselinou linolenovou při zhasení hydroxylových radikálů. (25)
  
- Metody založené na vychytávání superoxidového anionradikálu
  - Zde se využívá několik různých postupů, např. kombinace HPLC a chemiluminiscence

#### c) Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace

- Lipidová peroxidace vyvolaná volnými radikály je jedním z nejvýznamnějších patologických pochodů v organismu. (19) Látky, které potlačují lipidovou peroxidaci vedou k eliminaci iniciačních kyslíkových radikálů, sekundárně vzniklých radikálových meziproduktů a mohou mít i účinek chelatujících iontů přechodných kovů.
  
- K nejjednodušším testům patří metody založené na detekci produktů peroxidace kyseliny linolové. (19)

### 2) Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

#### a) Metody chemické

- Metoda FRAP (ferric reducing antioxidant potencial)
  - Při této metodě redukuje antioxidanty ze vzorku komplex  $\text{Fe}^{3+}$ -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ). Nárůst

absorbance při 593 nm odpovídající množství komplexu  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ je mírou antioxidační aktivity vzorku. (19)

- Určuje přímo redukční kapacitu sloučenin (9)

#### b) Metody elektrochemické

- Cyklická voltametrie
  - Indukuje schopnost látek odštěpovat elektrony. (10)  
Cyklická voltametrie je vhodná pro získání informace, zda látka je schopna snadno odevzdávat elektrony a poté je možné zvolit určitou metodu na stanovení antioxidační kapacity. (19)
- HPLC metody s elektrochemickou detekcí
  - Při těchto metodách je možné analyzovat komplexní směsi a identifikovat jednotlivé účinné antioxidační složky.

V moderní společnosti stoupá počet civilizačních onemocnění, která souvisí s působením volných radikálů, proto vzrůstá tendence hodnotit antioxidační vlastnosti čistých přírodních látek, rostlinných extraktů i potravinových doplňků. (19)

## **4.4 *HYPERICUM PERFORATUM* L. (*HYPERICACEAE*)**

*Hypericum perforatum* je tradiční léčivá rostlina.

Do podvědomí vstoupila již ve středověku, kdy se používala k léčbě infekcí a mírných nervových poruch (26) a léčebně se využívá už přes 2000 let. (27) Díky intenzivnímu studiu obsahových látek v posledních letech výrazně vzrostl její význam ve farmaceutickém průmyslu pro antivirové, protizánětlivé, antidepressivní, protirakovinové a antimikrobiální účinky naftodiantronových a floroglucinových derivátů. (26)

HP obsahuje přibližně 0,6-3 ml/kg silice, triterpeny a steroly. Je bohatá na fenolické sloučeniny: kávové kyseliny, chlorogenová kyselina, proanthokyanidiny a deriváty floroglucinolu. Vyskytují se v květech a plodech, kde se koncentrují v období zralosti. Patří sem hyperforin (2-4,5%), adhyperforin (0,2-1,8%) a flavonoidy. Flavonoidy jsou hojně zastoupené (2-4%) – hyperin, rutin, kvercitrin, isokvercitrin a bioflavonoidy. Hlavními flavonoidy jsou rutin, hyperosid, isokvercitrin, avikularin, kvercitrin, a kvercetin. V kvetoucích lodyhách se také nacházejí stopy xantonů. Sloučeniny, zodpovědné za barvu šťávy nacházející se v černých tečkách na listech a květech, jsou naftodiatrony (0,06-0,15%) – hypericin (biogeneticky odvozený od antronu) vyskytující se spolu s pseudohypericinem a v čerstvých rostlinách spolu s protohypericinem a protopseudohypericinem. (16, 28)

### **4.4.1 Biologická aktivita *HYPERICUM PERFORATUM***

Třezalka tečkovaná má velmi širokou oblast použití. Nejvíce se v dnešní době diskutuje o jejím využití v léčbě depresivních stavů.

#### **4.4.1.1 Deprese**

Depresivní nálady jsou velice nepříjemné stavy, které člověka potkávají a je třeba je léčit, protože snižují kvalitu života člověka a jeho vztahu s okolní společností, ale mohou dokonce jeho život ohrozit.

Deprese je familiárně vyskytující se onemocnění, z patofyziologického hlediska je deprese závislá na snížené dostupnosti noradrenalinu nebo serotoninu. (29)

HP inhibuje zpětné vychytávání monoaminových neurotransmiterů v biologických systémech. (27) Studie, které jsou k dispozici, dokazují, že extrakty z HP jsou velmi dobře tolerovány a ukazuje se, že jsou účinné v rutinní léčbě depresivních stavů (30). Publikována byla však i práce, která poukazuje na kontroverzní výsledky klinických výzkumů antidepresivního efektu HP, zatímco preklinické studie ukazovaly na antidepresivní vlastnosti extraktů HP. (31) Vliv na rozdílný obsah hyperforinu v komerčních přípravcích mají podmínky sušení a skladování. A právě ty jsou velmi důležitým faktorem, když srovnáváme preklinické a klinické studie při různých experimentálních podmínkách, protože aktuální koncentrace hyperforinu v přípravcích, které jsou studovány, může být zodpovědná za odlišné výsledky. (32)

Při depresi bývá často zvýšená hladina kortizonu v plazmě a cerebrospinální tekutině a studie naznačují, že extrakt z HP může upravit hladiny kortizonu a kortikosteronu pomocí působení na multilátkový transporter glykoprotein P (Pgp). (33) Ze studie vyplývá, že extrakt z HP dokáže výrazně snížit hladiny kortizonu a kortikosteronu v mozkové kůře, ale tyto změny nejsou patrné v séru.

Běžná syntetická antidepresiva, která se dnes používají, pracují mimo jiné na principu inhibice zpětného vychytávání monoaminových neurotransmiterů a některé dříve používané látky reagují i s muskarinovými, histaminovými a adrenergními receptory, což může vést k řadě nežádoucích účinků, jako je sucho v ústech, ortostatická hypotenze, sexuální dysfunkce, sedace, zácpa, atd. Jelikož u HP je pozorováno málo podobných vedlejších účinků, soudí se, že HP má minimální aktivitu na muskarinových a adrenergních receptorech. (27)

Třezalka tečkovaná je pravděpodobně nejvíce sledovaná rostlina vzhledem k její účinnosti, neškodnosti a toleranci u pacientů s depresivními symptomy. (27)

HP nemá žádný vliv na krevní tlak, srdeční frekvenci. Naproti tomu imipramin zvýšil klidový krevní tlak a srdeční tep a způsobil značnou ortostatickou tachykardii. (34)

Pokud jde o látky zodpovědné za aktivitu, hyperforin je považován za nejvíce aktivní sloučeninu v HP (27) ohledně antidepresivního působení. Vodně-

alkoholický extrakt obsahující velmi málo hyperforinu má také nedostatečný antidepresivní účinek. (32) Mezi hlavní účinky hyperforinu *in vitro* patří neselektivní inhibice zpětného vychytávání monoaminových neurotransmiterů, dále interakce s opioidními receptory a D<sub>1</sub> dopaminovými receptory.

Pokud jde o mechanismus antidepresivního působení HP, není ještě zcela jasný, ale převládá názor, že dochází k inhibici zpětného vychytávání monoaminových neurotransmiterů noradrenalinu, dopaminu a serotoninu, ale Schroeder ve své studii (34) tento názor odmítá a říká, že HP nemá žádný vliv na plazmatické koncentrace noradrenalinu a nesouhlasí s tím, že HP vede k velkým změnám uptake noradrenalinu nebo změnám aktivity monoaminoxidasy *in vivo*.

#### **4.4.1.1.2 Paměť**

HP má schopnost chránit před poruchami paměti, které bývají způsobeny stresem. Výzkum na toto téma prováděl Trofimiuk a kol. (35) Zjistili, že HP chrání před nepříznivými efekty jak chronického stresu, tak i dlouhodobého působení kortikosteronu na paměť a učení.

#### **4.4.1.1.3 Zánět**

Extrakt z HP vykazuje potenciální antiflogistický účinek u akutních zánětů na zvířecích modelech. Všechny parametry zánětu byly extraktem HP zmírněny. (36)

#### **4.4.1.1.4 Rakovina**

U nádorů prostaty bylo zjištěno, že selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a antagonisté serotoninu mají antiproliferativní efekt. Jelikož obsahové látky z HP účinkují i jako inhibitory zpětného vychytávání serotoninu, působí cytotoxicky na několik linií lidských rakovinových buněk. (37) Autor této studie naznačuje, že díky redukci nádorového růstu a počtu metastáz by extrakt HP mohl být užít v léčbě karcinomu prostaty.

#### **4.4.1.1.5 Epilepsie**

V tradiční medicíně se HP používala pro její antikonvulzivní vlastnosti. Hosseinzadeh ve své studii zkoumal antikonvulzivní působení *Hypericum perforatum* a zjistil, že extrakt z nadzemních částí rostliny může přispět ke kontrole

záchvatů *petit mal* a že tento účinek může být spojen s působením oxidu dusnatého (NO). (38)

Ve studii, kterou publikovali Luo a kol. (39) byl zjišťován inhibiční efekt flavonoidů obsažených v HP na NO-syntasu (NOS). Inhibiční efekt šesti flavonoidů kvercetin, kvercitrinu, hyperosidu, avikularinu, kemferolu a rutinu byl měřen spektrofotometricky za použití NOS z krve a mozku krys. Z přítomných sloučenin ukázaly kvercetin a hyperosid na koncentraci závislý efekt. Výsledky ukázaly, že efekt kvercetin a hyperosidu závisí na koncentraci a galaktosa vyskytující se v hyperosidu může být spojována se selektivní inhibicí NOS. V této studii byla určována NOS inhibiční aktivita. Kvercetin a hyperosid byly nejvíce aktivní sloučeniny, kdežto kvercitrin a rutin nevykazovaly žádný inhibiční efekt.

Oxid dusnatý je kritický mediátor, který funguje pro inter- i intrabuněčnou signalizaci, hraje důležitou roli v různých fyziologických procesech a patofyziologických stavech. NOS katalyzuje oxidaci terminální guanidinové skupiny L-argininu na NO. NO může reagovat se superoxidovým aniontovým radikálem za produkce více reaktivních oxidantů jako je peroxynitrát, který vede k buněčnému poškození, což bylo zjištěno některými patofyziologickými studiemi depresí a antidepresivně působících látek. (39) Nadprodukce NO může vést k endotoxickému šoku, diabetu, odvržení transplantovaného štěpu, mozkové ischemii, ale i k některým neurodegenerativním chorobám jako je Alzheimerova nemoc.

#### **4.4.1.1.6 Interakce**

*Hypericum perforatum* reaguje s jaterními mikrosomálními enzymy, které mají vliv na metabolismus širokého spektra látek a může ovlivnit jejich clearance a účinek.

Hlavními enzymy, které se podílejí na metabolismu léčiv v lidských játrech, jsou CYP 1A2 (theofylin), CYP 2A6 (methoxyfluran), CYP 2C9 (ibuprofen, mefenamová kyselina, fenytoin, warfarin, tolbutamid), CYP 21C9 (omeprazol), CYP 2D6 (klozapin, kodein, metoprolol, tricyklická antidepresiva), CYP 2E1 (halothan, enfluran, alkohol) CYP 3A4 (cyklosporin, erytromycin, ethinylestradiol, nifedipin, midazolam, terfenadin). Mnohé interakce mezi léčivy způsobené inhibicí

nebo indukci enzymů P450 jsou klinicky velmi významné. U induktorů a inhibitorů jaterních enzymů je nutno pamatovat na to, že po jejich vysazení dochází k opačné reakci. (40)

Současné studie ukazují, že interakce mezi HP a dalšími látkami mohou vést k indukci určitých forem CYP enzymů, ačkoliv u jiných došlo k inhibici. (27) Podávání HP vede k jednoznačné indukci metabolické aktivity enzymů CYP 2D2 a CYP 3A2 a inhibici CYP 2C6. Tento jev popisují ve své práci Dostálek (41) a kolektiv. Ve svém výzkumu použili 3 látky – tolbutamid (který je metabolizován CYP 2C6), dextromethorphan (je metabolizován CYP 2D2) a midazolam (je metabolizován CYP 3A2). Kvantitativní výsledky byly hodnoceny pomocí metody HPLC a byl zjištěn jasný pokles plochy pod křivkou (AUC) u dextromethorphanu a midazolamu a nárůst AUC u tolbutamidu. Účinek extraktu HP na metabolickou aktivitu CYP 450 zkoušeli na krysích játrech.

Při současném podávání HP a látek, které také inhibují zpětné vychytávání serotoninu, noradrenalinu a dopaminu, může dojít k potenciaci účinku a vše může vyústit až v serotoninový syndrom se závažnými klinickými projevy a důsledky. Největší riziko je u současného podávání fluoxetinu, paroxetinu, sertalinu a některých tricyklických antidepresiv.

V další studii (42) je poukazováno na to, že v důsledku indukce aktivity cytochromu CYP 3A4 došlo k nárůstu clearance mnoha látek a steroidů, jako jsou kortizol a ethinyleradiol. Donovan a kol. došli k závěru, že krátkodobé podávání HP nemění signifikantně koncentrace většiny cirkulujících androgenů u mužů a žen, ale může způsobit pokles u některých cirkulujících 5- $\alpha$ -redukovaných androgenů.

Ženy užívající orální hormonální kontracepci by měly počítat s tím, že HP může interferovat s účinností kontraceptiv. (43) HP může totiž vést ke zrychlení metabolizace ethinylestradiolu a norethidronu. Má i vliv na folikulární růst a ovulaci.

Hyperforin interaguje s jinými léčivy a snižuje jejich účinek, pokud jsou podávány společně s extrakty z HP. (44) Významná je například interakce HP s digoxinem. Bylo zjištěno, že pokud je podáván extrakt nebo jiný přípravek neobsahující hyperforin, nebo jsou-li podávány velmi nízké denní dávky práškové drogy „*Hypericum powder*“ (podávány želatinové tobolky obsahující 333 mg práškové drogy 3krát denně – denní dávka hyperforinu odpovídá přibližně

5,3 mg; nebo želatinové tobolky obsahující 166 mg podávány 3krát denně – denní dávka hyperforinu odpovídá přibližně 2,6 mg) obsahujícího hyperforin, nedochází k žádným závažným interakcím. Avšak kombinace s vysokými dávkami extraktu bohatého na hyperforin (přípravek Jarsin 300) vyústila v redukci AUC digoxinu za dobu 24 hodin ( $AUC_{0-24}$ ), v redukci maximální plazmatické koncentrace digoxinu ( $C_{max}$ ) a v redukci plazmatické koncentrace za 24 hodin po předešlé dávce. Interakce HP a digoxinu se liší podle druhu přípravků z HP a dávek a zdá se, že koreluje zejména s dávkou hyperforinu. (45)

Jiný mechanismus, prostřednictvím kterého mohou kombinace léčiv vyústit v nežádoucí účinky, je indukce P-glykoproteinu. (27)

#### **4.4.1.1.7 Fototoxicita**

Výzkumy farmakologických účinků hyperforinu a hypericinu odhalily, že hypericin (silná fotoaktivní složka (46)) způsobuje fototoxické alergické reakce. (44)

U pacientů podstupujících vysoké dávky UV-A-1 fototerapie může při suplementaci HP dojít k redukci minimální erythemální dávky (MED). I když současně publikované důkazy naznačují, že plazmatické hladiny hypericinu nejsou pravděpodobně příčinou klinické fototoxicity, bylo objeveno, že fotoaktivní sloučeniny mohou způsobit poškození DNA už v subtoxických a suberythemálních dávkách. Je to efekt, který nemusí být patrný po mnoho let. (46) Ale i když hypericin v kombinaci s UV-A zářením zvyšuje riziko fotogenotoxicity, u většiny pacientů je toto poškození způsobené kombinací UV-A fotoerapie a extraktu z HP relativně nízké a zdá se, že i fotosenzibilizace je při doporučeném dávkování třezalky vzácná klinická událost. (47)

#### **4.4.1.1.8 Těhotenství a kojení**

Popularita HP při léčbě deprese vzrůstá a v současné době stoupl zájem ohledně jejího užití v období těhotenství a kojení. Ve výzkumu, který provedli Gregoretti a kol. (48), byl extrakt HP podáván experimentálně zvířatům v období od dvou týdnů před spářením až po 21. den po porodu. Byly podávány dvě různé dávky (100 mg/kg a 1000 mg/kg). Zvířata byla postnatálně postupně do 21. dne usmrcena a po provedení mikroskopické analýzy vnitřních orgánů bylo zjištěno, že hlavně játra a ledviny byly velmi poškozeny. Poškození bylo patrné u obou dávek



podávaných během gravidity, ale také u zvířat, která byla exponována HP pouze během kojení.

Tyto výsledky jsou v rozporu se studií, kterou provedli Borges a kol. Došli k závěru, že HP se zdá být netoxická pro matku a nezasahuje ani do vývoje těhotenství během organogeneze. (49)

Důkazy o bezpečnosti užívání třezalky v období gravidity a laktace jsou ještě nedostačující.

#### **4.4.1.1.9 Spánek**

Klinické studie potvrzují, že při léčbě třezalkou dochází k úpravě spánku. (47)

#### **4.4.1.1.10 Použití**

Třezalka tečkovaná má široký rozptyl léčebného použití. Používá se jednak zevně, má hojivý účinek na kožní rány, ekzémy, popáleniny (17, 50), působí příznivě na pohmožděniny, otoky (39), bývá používána jako protizánětlivá látka a užívá se i vnitřně v léčbě astmatu (7), je to tradiční rostlina s antidepresivními účinky. (50) Extrakty HP jsou široce užívány v terapii afektivních poruch a je známo použití pro anxiolytické a kognitivní účinky. (51) Pro obsah tríslovin působí jako adstringens, antidiarhoikum, hemostatikum. (52)

Přípravky s obsahem HP příznivě ovlivňují strach, neklid a poruchy spánku. Nepůsobí sedativně, nejsou kardiotoxické, nevyvolávají sexuální dysfunkci, nezvyšují hmotnost, příznivě ovlivňují kognitivní funkce, nepůsobí anticholinergně, nevyvolávají kolapsové stavy. Výhodou je také bezpečnost při předávkování, snášenlivost a minimum nežádoucích účinků. (47)

Díky intenzivnímu studiu obsahových látek v posledních letech výrazně vzrostl zájem ve farmaceutickém průmyslu pro antivirové, protizánětlivé, protirakovinové a antimikrobiální účinky naftodiantronových a floroglucinových derivátů. (26)

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POMŮCKY

Butan-2-on p.a.

Čištěná voda

DPPH (SIGMA - ALDRICH CHEMIE GmbH, SNR)

Ethylacetát č.

Hyperosid (ROTH, SNR)

Kyselina boritá (roztok kyseliny borité 25,0 g/l) p.a.

Kyselina chlorogenová (ROTH, SRN)

Kyselina mravenčí bezvodá p.a.

Kyselina octová ledová p.a.

Kyselina šťavelová (roztok kyseliny šťavelové 20,0 g/l) p.a.

Lih 60%

Methanol

Difenylboryloxyethylamin (10,0 g/1l methanolu) (CARL ROTH, SRN)

Rutin (KOCH – LIGHT LABORATORIES, Anglie)

Tetrahydrofuran p.a.

Analytické váhy (KERN & SOHN GmbH, SRN)

Inkubační lázeň (HEIDOLPH, SNR)

Laboratorní váhy (KERN & SOHN GmbH, SRN)

Mlýnek (MOULINEX)

Odstředivka MPW 342 (FISHER SCIENTIFIC, SRN)

Spektrofotometr CE 1010 (CECIL INSTRUMENTS, Anglie)

Ultrazvuková lázeň (SONOREX RX 100H, SRN)

UV lampa (KRÜ Optronic, SRN)

Vakuová odparka (BÜCHI, FISHER SCIENTIFIC, SRN)

Vodní lázeň (GFL, SRN)

Silufol chromatografické desky (KAVALIER, Votice ČR)

## 5.2 ANALYZOVANÝ MATERIÁL

Nať třezalky tečkované *Hyperici herba* byla získána sběrem v lokalitě Zahorie a Komárno na Slovensku a dodána prostřednictvím firmy Fytopharma Malacky.

## 5.3 STANOVENÍ OBSAHU FLAVONOIDŮ

(provedeno postupem dle článku Crataegi folium cum flore ČL 2002 (53))

**Základní roztok.** 0,400 g práškové drogy (250) jsem ve 200 ml baňce smíchala se 40 ml lihu 60% (V/V) a zahřívala 10 min ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení jsem extrakt zfiltrovala přes chomáček vaty do 100,0 ml odměrné baňky. Chomáček vaty jsem vložila ke zbytku drogy ve 200 ml baňce, přidala jsem 40 ml lihu 60% (V/V) a zahřívala 10 min ve vodní lázni při 60 °C, za častého protřepávání. Po ochlazení jsem extrakt zfiltrovala do téže odměrné baňky. 200 ml baňku i filtr jsem promyla lihem 60% (V/V) a promývací tekutinu jsem přidala do odměrné baňky. Spojené roztoky jsem zředila lihem 60% (V/V) na 100,0 ml a roztok jsem zfiltrovala.

**Zkoušený roztok.** 5,0 ml základního roztoku jsem odpařila v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek jsem rozpustila v 8 ml směsi objemových dílů methanolu a kyseliny octové ledové (10 + 100) a převedla do 25,0 ml odměrné baňky. Baňku s kulatým dnem jsem promyla 3 ml směsi objemových dílů methanolu a kyseliny octové ledové (10 + 100) a promývací tekutinu jsem převedla do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku jsem přidala 10,0 ml roztoku, který obsahoval kyselinu boritou (25,0 g/l) a kyselinu šťavelovou (20,0 g/l) v kyselině mravenčí bezvodé a zředila kyselinou octovou bezvodou na 25,0 ml.

**Kontrolní roztok.** 5,0 ml základního roztoku jsem odpařila v baňce s kulatým dnem za sníženého tlaku do sucha. Zbytek jsem rozpustila v 8 ml směsi objemových dílů methanolu a kyseliny octové ledové (10 + 100) a převedla do 25,0 ml odměrné

baňky. Baňku s kulatým dnem jsem promyla 3 ml směsi objemových dílů methanolu a kyseliny octové ledové (10 + 100) a promývací tekutinu jsem převedla do téže odměrné baňky. K tomuto roztoku jsem přidala 10,0 ml kyseliny mravenčí bezvodé a zředila kyselinou octovou bezvodou na 25,0 ml.

Po 30 min jsem měřila absorbanci zkoušeného roztoku při 410 nm proti kontrolnímu roztoku.

Obsah flavonoidů v procentech, vyjádřeno jako hyperosid ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ), jsem vypočítala podle vzorce:

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

v němž značí:

A – absorbanci roztoku v maximu při 410 nm;

m – hmotnost zkoušené drogy v gramech.

Specifická absorbance hyperosidu má hodnotu 405.

Stanovení jsem provedla u každého vzorku 3krát.

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 1.a a 1.b

## 5.4 STANOVENÍ OBSAHU HYPERICINU

(provedeno postupem dle článku Hyperici herba ČL 2002 (53))

**Zkoušený roztok.** 0,800 g práškové drogy (500) jsem ve 100 ml baňce s kulatým dnem smíchala se 60 ml směsi objemových dílů čištěné vody a tetrahydrofuranu (20 + 80). Směs jsem vařila 30 min ve vodní lázni při 70 °C pod zpětným chladičem, za stáلهo protřepávání. Extakt jsem odstředila (2 min při 700 g, 2500 otáček) a supernatantní tekutinu jsem převedla do 250 ml baňky. Zbytek drogy jsem smíchala s 60 ml směsi objemových dílů čištěné vody a tetrahydrofuranu (20 + 80). Směs jsem opět zahřívala 30 min pod zpětným chladičem. Extrakt jsem opět

odstředila (2 min při 700 g, 2500 otáček) a supernatantní tekutinu jsem převedla do téže odměrné baňky. Spojené roztoky jsem odpařila do sucha. Zbytek jsem převedla 15 ml methanolu za pomoci ultrazvuku do 25,0 ml odměrné baňky. 250 ml baňku jsem promyla methanolem, promývací tekutinu jsem přidala k roztoku v odměrné baňce a spojené tekutiny jsem zředila methanolem na 25,0 ml. Opět jsem tekutinu odstředila, 10 ml roztoku jsem zfiltrovala filtrem ze slinutého skla (0,2 mm), první 2 ml filtrátu jsem odstranila. 5,0 ml filtrátu jsem převedla do odměrné baňky a zředila methanolem na 25,0 ml.

Měřila jsem absorbanci zkoušeného roztoku při 590 nm za použití methanolu jako kontrolní tekutiny.

Obsah všech hypericinů v procentech, vyjádřeno jako hypericin ( $C_{30}H_{16}O_8$ ), jsem vypočítala podle vzorce:

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

v němž značí:

A – absorbanci při 590 nm;

m – navážku drogy v gramech.

Specifická absorbance hypericinu má hodnotu 870.

Stanovení jsem provedla u každého vzorku 3krát.

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 2.a a 2.b

## **5.5 STANOVENÍ ZTRÁTY SUŠENÍM**

0,6000 g drogy (500) jsem navázila do předem vysušených a zvážených váženek a provedla stanovení postupem dle ČL 2002. (53) Stanovení jsem provedla u každého vzorku 3krát. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 3.a a 3.b

## 5.6 STANOVENÍ ZBYTKU PO VYSUŠENÍ EXTRAKTU

### **Vodný extrakt:**

0,500 g drogy (500) jsem zahřívala ve 100 ml baňce s 50 ml čištěné vody 30 minut na vodní lázni při 65°C pod zpětným chladičem, za občasného promíchávání. Po ochlazení jsem extrakt zfiltrovala do 50,0 ml odměrné baňky a doplnila vodou do 50,0 ml.

### **Methanolvý extrakt:**

0,500 g drogy (500) jsem zahřívala ve 100 ml baňce s 50 ml methanolu 30 minut na vodní lázni při 65°C pod zpětným chladičem, za občasného promíchávání. Po ochlazení jsem extrakt zfiltrovala do 50,0 ml odměrné baňky a doplnila methanolem do 50,0 ml.

Z každého extraktu jsem do předem vysušených (30 minut při 100 - 105°C v sušárně) a zvážených váženek převedla 2krát po 2 ml a extrakty jsem nechala odpařit do sucha na vodní lázni. Zbytek jsem sušila 3 h v sušárně při 100 °C až 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru nad oxidem fosforečným jsem vše zvážila. Výsledek jsem vyjádřila v g/ml.

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

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 4.a – 4.d

## **5.7 STANOVENÍ ANTIRADIKÁLOVÉ AKTIVITY**

### **5.7.1 Příprava roztoku DPPH**

Připravila jsem si 0,1% roztok DPPH (0,1 g DPPH jsem pomocí ultrazvuku rozpustila v methanolu v 50,0 ml odměrné baňce, 25,0 ml tohoto roztoku jsem zředila methanolem do 50,0 ml).

### **5.7.2 Příprava methanového extraktu z drogy**

0,5 g drogy (500) jsem smíchala s 50,0 ml methanolu a vařila 30 minut na vodní lázni při 65°C pod zpětným chladičem, za protřepávání. Po ochlazení jsem směs zfiltrovala do 50,0 ml odměrné baňky a doplnila methanolem do 50,0 ml. U vzorku *Hyperici herba* (sběr Komárno) jsem 0,5 ml tohoto extraktu převedla do 50,0 ml odměrné baňky a zředila methanolem do 50,0 ml. (zředění 100×). U vzorku *Hyperici herba* (sběr Zahorie) jsem 0,25 ml základního extraktu převedla do 50,0 ml odměrné baňky a zředila methanolem do 50,0 ml (zředění 200×).

### **5.7.3 Příprava vodného extraktu z drogy**

0,5 g drogy (500) jsem smíchala s 50,0 ml čištěné vody a vařila 30 minut na vodní lázni při 65°C pod zpětným chladičem, za protřepávání. Po ochlazení jsem směs zfiltrovala do 50,0 ml odměrné baňky a doplnila čištěnou vodou do 50,0 ml. 5,0 ml tohoto extraktu jsem převedla do 50 ml baňky s kulatým dnem a odpařila za sníženého tlaku do sucha. Odparek jsem rozpustila v methanolu, převedla do odměrné baňky a doplnila methanolem do 25,0 ml. U vzorku *Hyperici herba* (sběr Komárno) jsem 2,5 ml tohoto extraktu jsem převedla do 25,0 ml odměrné baňky a doplnila methanolem do 25,0 ml (zředění 50×). U vzorku *Hyperici herba* (sběr Zahorie) jsem 1,25 ml základního extraktu převedla do 25,0 ml odměrné baňky a doplnila methanolem do 25,0 ml (zředění 100×).

### **5.7.4 Stanovení antiradikálové aktivity extraktů**

Připravila jsem si řadu kalibrovaných zkumavek, do kterých jsem napipetovala příslušné množství methanového extraktu drogy (od 0,1 ml po

2,2 ml). Poté jsem do každé zkumavky přidala 100 µl methanového roztoku DPPH a doplnila methanolem na 5,0 ml. Zkumavky jsem ponechala inkubovat 30 minut při 37°C a poté jsem změřila absorbanci při 517 nm proti methanolu.

Z každého vzorku byly připraveny 3 extrakty, každá koncentrace byla měřena 3krát (3 řady), u každé řady byl jako porovnávací roztok použit roztok DPPH a methanolu.

Výsledky jsou vyjádřeny v % redukce a vypočteny ze vztahu

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

$A_{vz}$  – absorbance zkoušeného vzorku

$A_{sv}$  – absorbance slepého vzorku

Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 5.a – 8.f

## **5.7.5 Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu po semipreparativní TLC**

### **5.7.5.1 Extrakce drogy:**

Extrakty z drog (methanolvý a vodný) byly připraveny postupem dle 4.7.2 a 4.7.3 (základní extrakty, dále neupravované)

### **5.7.5.2 Tenkovrstvá chromatografie**

Nanášela jsem 250 µl extraktu do proužku, chromatogram jsem vyvíjela v soustavě ethylacetát + kyselina mravenčí + čištěná voda (v poměru 90+6+9) po dráze 10 cm. Z každého extraktu jsem nanasla 3 chromatogramy. Desky jsem nechala do druhého dne do odvětrání rozpouštědla. Z každé desky jsem vyškrobala pruh odpovídající hyperosidu a z každé trojice desek jeden pruh ze spodní části pod startem, kde přišel silikagel do kontaktu pouze s vyvíjecí soustavou. Hyperosid jsem eluovala pomocí ultrazvuku (4 minuty) v 5 ml methanolu, přefiltrovala přes fritu za sníženého tlaku a doplnila methanolem do 5,0 ml v odměrné baňce



### **5.7.5.3 Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu:**

Do kalibrovaných zkumavek jsem odebrala 4,0 ml filtrátu, přidala 100 µl roztoku DPPH a doplnila methanolem do 5,0 ml. Zkumavky jsem ponechala inkubovat 30 minut při 37°C a poté jsem změřila absorbanci při 517 nm proti methanolu.

Výsledky stanovení jsou uvedeny v tabulkách č. 9.a – 12.c

## **5.8 DŮKAZ OBSAHOVÝCH LÁTEK *HYPERICI HERBA* POMOCÍ TLC**

Provedeno postupem dle článku *Hyperici herba* a *Crataegi folium cum flore* ČL 2002. (53)

Methanolvý extrakt: 0,5 g práškové drogy (500) jsem smíchala s 10 ml methanolu, zahřívala 10 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem při 60 °C a po ochlazení jsem směs zfiltrovala.

Vodný extrakt: 0,5 g práškové drogy (500) jsem smíchala s 50 ml čištěné vody, zahřívala 10 minut na vodní lázni pod zpětným chladičem při 60 °C a po ochlazení jsem směs zfiltrovala. Poté jsem extrakt na odpařovací misce na vodní lázni mírně zahustila.

Nanášela jsem v množství 10 a 20 µl do proužků na desku Silufol. Jako porovnávací látky byly použity rutin, hyperosid a kyselina chlorogenová, 0,1 % roztoky v methanolu, nanášeno 5 a 10 µl.

Chromatogramy jsem vyvíjela v soustavách: kyselina mravenčí + voda + ethylacetát (6+9+90) a kyselina mravenčí + voda + butan-2-on + ethylacetát (10+10+30+50) po dráze 10 cm. Chromatogramy jsem nechala usušit a odvětrat rozpouštědla a detekovala jsem je postříkem těmito činidly: difenylboryloxyethylamin (po 30 minutách jsem chromatogramy pozorovala na denním světle a v ultrafialovém světle při 365 nm), methanolvý roztok DPPH (pozorovala jsem na denním světle).

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 TABULKOVÁ ČÁST

#### 6.1.1 Stanovení obsahu flavonoidů

**Tab. 1a: Stanovení obsahu flavonoidů – Hyperici herba (sběr Komárno)**

Navážka drogy [g]	A	Obsah flavonoidů - přepočteno na vysušenou drogu [%]	Průměr [%]
0,3692	0,916	3,0641	3,0961 ± 0,0227
0,3707	0,935	3,1150	
0,3706	0,933	3,1092	

**Tab. 1b: Stanovení obsahu flavonoidů – Hyperici herba (sběr Zahorie)**

Navážka drogy [g]	A	Obsah flavonoidů - přepočteno na vysušenou drogu [%]	Průměr [%]
0,3694	1,279	4,2760	4,3091 ± 0,0251
0,3704	1,294	4,3145	
0,3702	1,300	4,3368	

## 6.1.2 Stanovení obsahu hypericinu

Tab. 2a: Stanovení obsahu hypericinu - Hyperici herba (sběr Komárno)

Navážka drogy [g]	A	Obsah hypericinu - přepočteno na vysušenou drogu [%]	Průměr [%]
0,7381	0,415	0,0808	0,0774 ± 0,0024
0,7374	0,387	0,0754	
0,7376	0,390	0,0760	

Tab. 2b: Stanovení obsahu hypericinu - Hyperici herba (sběr Zahorie)

Navážka drogy [g]	A	Obsah hypericinu - přepočteno na vysušenou drogu [%]	Průměr [%]
0,7389	0,806	0,1567	0,1571 ± 0,0021
0,7385	0,822	0,1599	
0,7382	0,795	0,1547	

## 6.1.3 Ztráta sušením

Tab. 3a: Ztráta sušením - Hyperici herba (sběr Komárno)

Navážka drogy [g]	Ztráta sušením [%]	Průměr [%]
0,6087	7,8692	7,9213 ± 0,0531
0,6063	7,9004	
0,6242	7,9942	

Tab. 3b: Ztráta sušením – Hyperici herba (sběr Zahorie)

Navážka drogy [g]	Ztráta sušením [%]	Průměr [%]
0,6103	7,8978	7,8162 ± 0,1339
0,7320	7,9235	
0,6516	7,6274	

#### 6.1.4 Zbytek po odpaření extraktů

**Tab. 4a: Zbytek po odpaření - methanolový extrakt (sběr Komárno)**

Navážka [g] /50ml	Zbytek po odpaření [g]/2ml	Průměr [g]/2ml
0,5002	0,0042	0,0043 ± 0,0001
	0,0044	

**Tab. 4b: Zbytek po odpaření - vodný extrakt (sběr Komárno)**

Navážka [g] /50ml	Zbytek po odpaření [g]/2ml	Průměr [g]/2ml
0,5007	0,0057	0,0058 ± 0,0001
	0,0059	

**Tab. 4c: Zbytek po odpaření - methanolový extrakt (sběr Zahorie)**

Navážka [g] /50ml	Zbytek po odpaření [g]/2ml	Průměr [g]/2ml
0,5053	0,0056	0,00565 ± 0,0001
	0,0057	

**Tab. 4d: Zbytek po odpaření - vodný extrakt (sběr Zahorie)**

Navážka [g] /50ml	Zbytek po odpaření [g]/2ml	Průměr [g]/2ml
0,5035	0,0062	0,00615 ± 0,0001
	0,0061	

## 6.1.5 Stanovení antiradikálové aktivity

### 6.1.5.1 Methanолоvé extrakty (sběr Komárno)

Tab. 5a: Stanovení antiradikálové aktivity - methanолоvý extrakt (sběr Komárno)

Výluh č. I, řada 1.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [μg]	A	AA [%]
0,0	-	0,471	-
0,3	6,4566	0,363	22,9299
0,5	10,7610	0,345	26,7516
1,0	21,5220	0,225	52,2293
1,2	25,8264	0,190	59,6603
1,6	34,4352	0,112	76,2208
2,0	43,0440	0,058	87,6858
2,2	47,3484	0,041	91,2951
Výluh č. I, řada 2.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [μg]	A	AA [%]
0,0	-	0,465	-
0,3	6,4566	0,360	22,5806
0,5	10,7610	0,346	25,5914
1,0	21,5220	0,228	50,9677
1,2	25,8264	0,193	58,4946
1,6	34,4352	0,104	77,6344
2,0	43,0440	0,058	87,5269
2,2	47,3484	0,047	89,8925
Výluh č. I, řada 3.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [μg]	A	AA [%]
0,0	-	0,476	-
0,3	6,4566	0,363	23,7395
0,5	10,7610	0,358	24,7899
1,0	21,5220	0,230	51,6807
1,2	25,8264	0,184	61,3445
1,6	34,4352	0,118	75,2101
2,0	43,0440	0,062	86,9748
2,2	47,3484	0,043	90,9664

Absorbance u extraktu v množství 0,0 ml odpovídá roztoku DPPH v methanolu.

Tab. 5b: Průměrné hodnoty AA methanолоvého extraktu (Komárno)

Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [μg]	AA [%]	s [±]
0,0	-	-	-
0,3	6,4566	23,0833	0,4854
0,5	10,7610	25,7110	0,8053
1,0	21,5220	51,6259	0,5165
1,2	25,8264	59,8331	1,1699
1,6	34,4352	76,3551	0,9943
2,0	43,0440	87,3958	0,3047
2,2	47,3484	90,7180	0,5989

**Tab. 5c: Stanovení antiradikálové aktivity – methanolvý extrakt (sběr Komárno)**

Výluh č. II, řada 1.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,380	-
0,3	6,5172	0,285	25,0000
0,5	10,8620	0,260	31,5789
1,0	21,7240	0,163	57,1053
1,2	26,0688	0,120	68,4211
1,6	34,7584	0,069	81,8421
2,0	43,4480	0,031	91,8421
2,2	47,7928	0,027	92,8947
Výluh č. II, řada 2.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,412	-
0,3	6,5172	0,312	24,2718
0,5	10,8620	0,276	33,0097
1,0	21,7240	0,169	58,9806
1,2	26,0688	0,127	69,1748
1,6	34,7584	0,074	81,7961
2,0	43,4480	0,033	91,9903
2,2	47,7928	0,030	92,7184
Výluh č. II, řada 3.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,379	-
0,3	6,5172	0,290	23,4828
0,5	10,8620	0,261	31,1346
1,0	21,7240	0,165	56,4644
1,2	26,0688	0,120	68,3377
1,6	34,7584	0,068	82,0580
2,0	43,4480	0,034	91,0290
2,2	47,7928	0,030	92,0844

Absorbance u extraktu v množství 0,0 ml odpovídá roztoku DPPH v methanolu.

**Tab. 5d: Průměrné hodnoty AA methanolového extraktu (Komárno)**

Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	AA [%]	s [±]
0,0	-	-	-
0,3	6,5172	24,2515	0,6196
0,5	10,8620	31,9077	0,8000
1,0	21,7240	57,5168	1,0676
1,2	26,0688	68,6445	0,3765
1,6	34,7584	81,8987	0,1142
2,0	43,4480	91,6205	0,4226
2,2	47,7928	92,5658	0,3480

**Tab. 5e: Stanovení antiradikálové aktivity – methanolvý extrakt (sběr Komárno)**

Výluh č. III, řada 1.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,374	-
0,3	6,4278	0,314	16,0428
0,5	10,7130	0,280	25,1337
1,0	21,4260	0,191	48,9305
1,2	25,7112	0,155	58,5561
1,6	34,2816	0,090	75,9358
2,0	42,8520	0,097	87,4332
2,2	47,1372	0,035	90,6417
Výluh č. III, řada 2.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,377	-
0,3	6,4278	0,315	16,4456
0,5	10,7130	0,290	23,0769
1,0	21,4260	0,185	50,9284
1,2	25,7112	0,150	60,2122
1,6	34,2816	0,091	75,8621
2,0	42,8520	0,043	88,5942
2,2	47,1372	0,038	89,9204
Výluh č. III, řada 3.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,376	-
0,3	6,4278	0,312	17,0213
0,5	10,7130	0,280	25,5319
1,0	21,4260	0,190	49,4681
1,2	25,7112	0,151	59,8404
1,6	34,2816	0,094	75,0000
2,0	42,8520	0,045	88,0319
2,2	47,1372	0,036	90,4255

Absorbance u extraktu v množství 0,0 ml odpovídá roztoku DPPH v methanolu.

**Tab. 5f: Průměrné hodnoty AA methanolvého extraktu (Komárno)**

Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	AA [%]	s [±]
0,0	-	-	-
0,3	6,4278	16,5032	0,4015
0,5	10,7130	24,7757	1,0758
1,0	21,4260	49,7757	0,8441
1,2	25,7112	59,5362	0,7095
1,6	34,2816	75,5993	0,4248
2,0	42,8520	88,0198	0,4741
2,2	47,1372	90,3292	0,3022

### 6.1.5.2 Methanolvé extrakty (sběr Zahorie)

**Tab. 6a: Stanovení antiradikálové aktivity - methanolvý extrakt (sběr Zahorie)**

Výluh č. I, řada 1.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,377	-
0,3	4,1856	0,334	11,4058
0,5	6,9760	0,294	22,0159
1,0	13,9520	0,231	38,7268
1,2	16,7424	0,196	48,0106
1,6	22,3232	0,140	62,8647
2,0	27,9040	0,086	77,1883
2,2	30,6944	0,066	82,4934
Výluh č. I, řada 2.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,384	-
0,3	4,1856	0,340	11,4583
0,5	6,9760	0,297	22,6563
1,0	13,9520	0,233	39,3229
1,2	16,7424	0,204	46,8750
1,6	22,3232	0,138	64,0625
2,0	27,9040	0,086	77,6042
2,2	30,6944	0,071	81,5104
Výluh č. I, řada 3.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,378	-
0,3	4,1856	0,333	11,9048
0,5	6,9760	0,293	22,4868
1,0	13,9520	0,223	41,0053
1,2	16,7424	0,200	47,0899
1,6	22,3232	0,133	64,8148
2,0	27,9040	0,086	77,2487
2,2	30,6944	0,058	84,6561

Absorbance u extraktu v množství 0,0 ml odpovídá roztoku DPPH v methanolu

**Tab. 6b: Průměrné hodnoty AA methanolvého extraktu (Zahorie)**

Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	AA [%]	s [±]
0,0	-	-	-
0,3	4,1856	11,5896	0,2239
0,5	6,9760	22,3863	0,2709
1,0	13,9520	39,3517	0,9648
1,2	16,7424	47,3252	0,4926
1,6	22,3232	63,9140	0,8030
2,0	27,9040	77,3471	0,1835
2,2	30,6944	82,8866	1,3140



**Tab. 6c: Stanovení antiradikálové aktivity – methanolvý extrakt (sběr Zahorie)**

<b>Výluh č. II, řada 1.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,376	-
0,3	4,2399	0,326	13,2979
0,5	7,0665	0,292	22,3404
1,0	14,1330	0,219	41,7553
1,2	16,9596	0,194	48,4043
1,6	22,6128	0,139	63,0319
2,0	28,2330	0,083	77,9255
2,2	31,0926	0,061	83,7766
<b>Výluh č. II, řada 2.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,381	-
0,3	4,2399	0,329	13,6483
0,5	7,0665	0,299	21,5223
1,0	14,1330	0,227	40,4199
1,2	16,9596	0,200	47,5066
1,6	22,6128	0,141	62,9921
2,0	28,2660	0,085	77,6903
2,2	31,0926	0,062	83,7270
<b>Výluh č. II, řada 3.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,379	-
0,3	4,2399	0,330	12,9288
0,5	7,0665	0,294	22,4274
1,0	14,1330	0,224	40,8971
1,2	16,9596	0,200	47,2296
1,6	22,6128	0,144	62,0053
2,0	28,2660	0,086	77,3087
2,2	31,0926	0,063	83,3773

Absorbance u extraktu v množství 0,0 ml odpovídá roztoku DPPH v methanolu

**Tab. 6d: Průměrné hodnoty AA methanolového extraktu (Zahorie)**

<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>AA [%]</b>	<b>s [±]</b>
0,0	-	-	-
0,3	4,2399	13,2917	0,2938
0,5	7,0665	22,0967	0,4077
1,0	14,1330	41,0241	0,5525
1,2	16,9596	47,7135	0,5014
1,6	22,6128	62,6764	0,4748
2,0	28,2660	77,6415	0,2542
2,2	31,0926	83,6270	0,1777

**Tab. 6e: Stanovení antiradikálové aktivity – methanolvý extrakt (sběr Zahorie)**

<b>Výluh č. III, řada 1.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,384	-
0,3	4,2066	0,331	13,8021
0,5	7,0110	0,293	23,6979
1,0	14,0220	0,222	42,1875
1,2	16,8264	0,203	47,1354
1,6	22,4352	0,140	63,5417
2,0	28,0440	0,089	76,8229
2,2	30,8484	0,069	82,0313
<b>Výluh č. III, řada 2.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,384	-
0,3	4,2066	0,331	13,8021
0,5	7,0110	0,296	22,9167
1,0	14,0220	0,223	41,9271
1,2	16,8264	0,200	47,9167
1,6	22,4352	0,140	63,5417
2,0	28,0440	0,088	77,0833
2,2	30,8484	0,066	82,8125
<b>Výluh č. III, řada 3.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,392	-
0,3	4,2066	0,334	14,7959
0,5	7,0110	0,300	23,4694
1,0	14,0220	0,230	41,3265
1,2	16,8264	0,208	46,9388
1,6	22,4352	0,142	63,7755
2,0	28,0440	0,090	77,0408
2,2	30,8484	0,071	81,8878

Absorbance u extraktu v množství 0,0 ml odpovídá roztoku DPPH v methanolu

**Tab. 6f: Průměrné hodnoty AA methanolového extraktu (Zahorie)**

<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>AA [%]</b>	<b>s [±]</b>
0,0	-	-	-
0,3	4,2066	14,1334	0,4685
0,5	7,0110	23,3613	0,3280
1,0	14,0220	41,8137	0,3605
1,2	16,8264	47,3303	0,4223
1,6	22,4352	63,6196	0,1102
2,0	28,0440	76,9823	0,1141
2,2	30,8484	82,2439	0,4063

### 6.1.5.3 Vodné extrakty (sběr Komárno)

**Tab. 7a: Stanovení antiradikálové aktivity – vodný extrakt (sběr Komárno)**

Výluh č. I, řada 1.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,397	-
0,1	5,7932	0,317	20,1511
0,3	17,3796	0,243	38,7909
0,5	28,9660	0,189	52,3929
0,6	34,7592	0,141	64,4836
0,8	46,3456	0,100	74,8111
1,0	57,9320	0,055	86,1461
Výluh č. I, řada 2.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,387	-
0,1	5,7932	0,307	20,6718
0,3	17,3796	0,242	37,4677
0,5	28,9660	0,190	50,9044
0,6	34,7592	0,147	62,0155
0,8	46,3456	0,101	73,9018
1,0	57,9320	0,052	86,5633
Výluh č. I, řada 3.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,405	-
0,1	5,7932	0,317	21,7284
0,3	17,3796	0,256	36,7901
0,5	28,9660	0,200	50,6173
0,6	34,7592	0,150	62,9630
0,8	46,3456	0,108	73,3333
1,0	57,9320	0,058	85,4505

Absorbance u extraktu v množství 0,0 ml odpovídá roztoku DPPH v methanolu

**Tab. 7b: Průměrné hodnoty AA vodného extraktu (Komárno)**

Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	AA [%]	s [±]
0,0	-	-	-
0,1	5,7932	20,8504	0,6562
0,3	17,3796	37,6829	0,8309
0,5	28,9660	51,3049	0,7782
0,6	34,7592	63,1540	1,0166
0,8	46,3456	74,0154	0,6086
1,0	57,9320	86,1295	0,4590

**Tab. 7c: Stanovení antiradikálové aktivity – vodný extrakt (sběr Komárno)**

<b>Výluh č. II, řada 1.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,378	-
0,1	5,7720	0,318	15,8730
0,3	17,3160	0,265	29,8942
0,5	28,8600	0,196	49,2063
0,6	34,6320	0,136	64,0212
0,8	46,1760	0,103	72,7513
1,0	57,7200	0,062	83,5979
<b>Výluh č. II, řada 2.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,410	-
0,1	5,7720	0,347	15,3659
0,3	17,3160	0,276	32,6829
0,5	28,8600	0,201	50,9756
0,6	34,6320	0,148	63,9024
0,8	46,1760	0,108	73,6585
1,0	57,7200	0,062	84,8780
<b>Výluh č. II, řada 3.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,399	-
0,1	5,7720	0,338	15,2882
0,3	17,3160	0,280	29,8246
0,5	28,8600	0,201	49,6241
0,6	34,6320	0,151	62,1554
0,8	46,1760	0,105	73,6842
1,0	57,7200	0,056	85,9649

Absorbance u extraktu v množství 0,0 ml odpovídá roztoku DPPH v methanolu

**Tab. 7d: Průměrné hodnoty AA vodného extraktu (Komárno)**

<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>AA [%]</b>	<b>s [±]</b>
0,0	-	-	-
0,1	5,7720	15,5090	0,2593
0,3	17,3160	30,8006	1,3313
0,5	28,8600	49,9353	0,7551
0,6	34,6320	63,3596	0,8529
0,8	46,1760	73,3647	0,4338
1,0	57,7200	84,8136	0,9674

**Tab. 7e: Stanovení antiradikálové aktivity – vodný extrakt (sběr Komárno)**

<b>Výluh č. III, řada 1.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,410	-
0,1	5,8384	0,318	22,4390
0,3	17,5152	0,240	41,4634
0,5	29,1920	0,165	59,7561
0,6	35,0304	0,133	67,5610
0,8	46,7072	0,081	80,2439
1,0	58,3840	0,043	89,5122
<b>Výluh č. III, řada 2.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,411	-
0,1	5,8384	0,033	20,4380
0,3	17,5152	0,243	40,8759
0,5	29,1920	0,165	59,8540
0,6	35,0304	0,133	67,6400
0,8	46,7072	0,082	80,0487
1,0	58,3840	0,045	89,0511
<b>Výluh č. III, řada 3.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,399	-
0,1	5,8384	0,314	21,3033
0,3	17,5152	0,238	40,3509
0,5	29,1920	0,160	59,8997
0,6	35,0304	0,121	69,6742
0,8	46,7072	0,079	80,2005
1,0	58,3840	0,040	89,9749

Absorbance u extraktu v množství 0,0 ml odpovídá roztoku DPPH v methanolu

**Tab. 7f: Průměrné hodnoty AA vodného extraktu (Komárno)**

<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>AA [%]</b>	<b>s [±]</b>
0,0	-	-	-
0,1	5,8384	21,3934	0,8194
0,3	17,5152	40,8967	0,4544
0,5	29,1920	59,8366	0,0599
0,6	35,0304	68,2917	0,9781
0,8	46,7072	80,1643	0,0837
1,0	58,3840	89,5127	0,3771

#### 6.1.5.4 Vodné extrakty (sběr Zahorie)

**Tab. 8a: Stanovení antiradikálové aktivity – vodný extrakt (sběr Zahorie)**

Výluh č. I, řada 1.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,346	-
0,1	3,0756	0,305	11,8497
0,3	9,2268	0,242	29,7688
0,5	15,3780	0,190	45,0867
0,8	24,6048	0,110	68,2081
1,0	30,7560	0,063	81,7919
1,2	36,9072	0,051	85,2601
Výluh č. I, řada 2.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,348	-
0,1	3,0756	0,306	12,0690
0,3	9,2268	0,250	28,1609
0,5	15,3780	0,193	44,5409
0,8	24,6048	0,110	68,3908
1,0	30,7560	0,062	82,1839
1,2	36,9072	0,050	85,6322
Výluh č. I, řada 3.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,352	-
0,1	3,0756	0,315	10,5114
0,3	9,2268	0,255	27,5568
0,5	15,3780	0,200	43,1818
0,8	24,6048	0,108	69,3182
1,0	30,7560	0,060	82,9545
1,2	36,9072	0,046	86,9318

Absorbance u extraktu v množství 0,0 ml odpovídá roztoku DPPH v methanolu

**Tab. 8b: Průměrné hodnoty AA vodného extraktu (Zahorie)**

Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	AA [%]	s [±]
0,0	-	-	-
0,1	3,0756	11,4767	0,6884
0,3	9,2268	28,4955	0,9335
0,5	15,3780	44,2696	0,8010
0,8	24,6048	68,6390	0,4860
1,0	30,7560	82,3101	0,4829
1,2	36,9072	85,9414	0,7166

**Tab. 8c: Stanovení antiradikálové aktivity – vodný extrakt (sběr Zahorie)**

Výluh č. II, řada 1.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,314	-
0,1	3,0720	0,284	9,5541
0,3	9,2160	0,228	27,3885
0,5	15,3600	0,173	44,9045
0,8	24,5760	0,092	70,7006
1,0	30,7200	0,054	82,8025
1,2	36,8640	0,047	85,0318
Výluh č. II, řada 2.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,309	-
0,1	3,0720	0,276	10,6796
0,3	9,2160	0,219	29,1262
0,5	15,3600	0,169	45,3074
0,8	24,5760	0,095	69,2557
1,0	30,7200	0,054	82,5243
1,2	36,8640	0,043	86,0841
Výluh č. II, řada 3.			
Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	A	AA [%]
0,0	-	0,309	-
0,1	3,0720	0,279	9,7087
0,3	9,2160	0,219	29,1262
0,5	15,3600	0,167	45,9547
0,8	24,5760	0,090	70,8738
1,0	30,7200	0,049	84,1424
1,2	36,8640	0,044	85,7605

Absorbance u extraktu v množství 0,0 ml odpovídá roztoku DPPH v methanolu

**Tab. 8d: Průměrné hodnoty AA vodného extraktu (Zahorie)**

Extrakt [ml]	Zbytek po odpaření [µg]	AA [%]	s [±]
0,0	-	-	-
0,1	3,0720	9,9808	0,4981
0,3	9,2160	28,5470	0,8192
0,5	15,3600	45,3889	0,4326
0,8	24,5760	70,2767	0,7254
1,0	30,7200	83,3624	0,7064
1,2	36,8640	85,6255	0,4401

**Tab. 8e: Stanovení antiradikálové aktivity – vodný extrakt (sběr Zahorie)**

<b>Výluh č. III, řada 1.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,319	-
0,1	3,0940	0,275	13,7931
0,3	9,2820	0,225	29,4671
0,5	15,4700	0,163	48,9028
0,8	24,7520	0,087	72,7272
1,0	30,9400	0,046	85,5799
1,2	37,1280	0,038	88,0878
<b>Výluh č. III, řada 2.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,319	-
0,1	3,0940	0,274	14,1066
0,3	9,2820	0,221	30,7210
0,5	15,4700	0,160	49,8433
0,8	24,7520	0,088	72,4138
1,0	30,9400	0,050	84,3260
1,2	37,1280	0,380	88,0878
<b>Výluh č. III, řada 3.</b>			
<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>A</b>	<b>AA [%]</b>
0,0	-	0,314	-
0,1	3,0940	0,273	13,0573
0,3	9,2820	0,225	28,3439
0,5	15,4700	0,159	49,3631
0,8	24,7520	0,086	72,6115
1,0	30,9400	0,052	83,4395
1,2	37,1280	0,043	86,3057

Absorbance u extraktu v množství 0,0 ml odpovídá roztoku DPPH v methanolu

**Tab. 8f: Průměrné hodnoty AA vodného extraktu (Zahorie)**

<b>Extrakt [ml]</b>	<b>Zbytek po odpaření [µg]</b>	<b>AA [%]</b>	<b>s [±]</b>
0,0	-	-	-
0,1	3,0940	13,6523	0,4398
0,3	9,2820	30,2421	0,9709
0,5	15,4700	49,3697	0,3840
0,8	24,7520	72,5842	0,1294
1,0	30,9400	84,4485	0,8781
1,2	37,1280	87,4938	0,8401



## 6.1.6 Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu

### 6.1.6.1 Methanolvý extrakt (sběr Komárno):

- Navážka drogy 0,5002g
  - Hmotnost odparku 0,0043g/2ml extraktu  
Hmotnost odparku 0,1075g/50ml extraktu  
Navážce drogy 0,5002g odpovídá 0,1075g odparku/50ml
1. Navážka drogy 0,5007g  
Navážce drogy 0,5002g odpovídá 0,1075g odparku/50ml  
Navážce drogy 0,5007g odpovídá 0,10761g odparku/50ml  
Navážce drogy 0,5007g odpovídá **0,53805mg** odparku/0,250ml

**Tab. 9a: Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu - methanolvý extrakt (sběr Komárno)**

Výluh č. I, řada 1.				
Navážka drogy [g]/50ml	Zbytek po odpaření [mg]/0,250ml	A	AA [%]	Průměr [%]
0,5007	0,53805	0,416	-	-
		0,402	3,3654	-
		0,331	20,4327	19,9518 ± 0,6799
		0,337	18,9904	
		0,331	20,4327	

AA 3,3654 % odpovídá proužku, kde přišel silikagel do kontaktu pouze s vyvíjecí soustavou; Absorbance 0,416 odpovídá roztoku DPPH v methanolu

2. Navážka drogy 0,5054g  
 Navážce drogy 0,5002g odpovídá 0,1075g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,5054g odpovídá 0,10862g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,5054g odpovídá **0,5431mg** odparku/0,250ml

**Tab. 9b: Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu - methanolvý extrakt (sběr Komárno)**

Výluh č. II				
Navážka drogy [g]/50ml	Zbytek po odpaření [mg]/0,250ml	A	AA [%]	Průměr [%]
0,5054	0,5431	0,358	-	-
		0,342	4,4693	-
		0,280	21,7877	22,0670 ± 0,2281
		0,278	22,3464	
		0,279	22,0670	

AA 4,4693 % odpovídá proužku, kde přišel silikagel do kontaktu pouze s vyvíjecí soustavou; Absorbance 0,358 odpovídá roztoku DPPH v methanolu

3. Navážka drogy 0,4985g  
 Navážce drogy 0,5002g odpovídá 0,1075g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,4985g odpovídá 0,10713g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,4985g odpovídá **0,5375mg** odparku/0,250ml

**Tab. 9c: Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu - methanolvý extrakt (sběr Komárno)**

Výluh č. III				
Navážka drogy [g]/50ml	Zbytek po odpaření [mg]/0,250ml	A	AA [%]	Průměr [%]
0,4985	0,5375	0,358	-	-
		0,342	4,4693	-
		0,291	18,7151	19,4600 ± 0,5739
		0,286	20,1117	
		0,288	19,5531	

AA 4,4693 % odpovídá proužku, kde přišel silikagel do kontaktu pouze s vyvíjecí soustavou; Absorbance 0,358 odpovídá roztoku DPPH v methanolu

### 6.1.6.2 Methanolvý extrakt (sběr Zahorie):

- Navážka drogy 0,5053g
  - Hmotnost odparku 0,00565g/2ml extraktu  
Hmotnost odparku 0,14125g/50ml extraktu  
Navážce drogy 0,5053g odpovídá 0,14125g odparku/50ml
1. Navážka drogy 0,4991g  
Navážce drogy 0,5053g odpovídá 0,14125g odparku/50ml  
Navážce drogy 0,4991g odpovídá 0,13925g odparku/50ml  
Navážce drogy 0,4991g odpovídá **0,6976mg** odparku/0,250ml

**Tab. 10a: Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu - methanolvý extrakt (sběr Zahorie)**

Výluh č. I				
Navážka drogy [g]/50ml	Zbytek po odpaření [mg]/0,250ml	A	AA [%]	Průměr [%]
0,4991	0,6976	0,363	-	-
		0,337	7,1625	-
		0,207	42,9752	42,0569 ± 0,9365
		0,215	40,7713	
		0,209	42,4242	

AA 7,1625 % odpovídá proužku, kde přišel silikagel do kontaktu pouze s vyvíjecí soustavou; Absorbance 0,363 odpovídá roztoku DPPH v methanolu

2. Navážka drogy 0,5065g  
 Navážce drogy 0,5053g odpovídá 0,14125g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,5065g odpovídá 0,14133g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,5065g odpovídá **0,70665mg** odparku/0,250ml

**Tab. 10b: Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu - methanolvý extrakt (sběr Zahorie)**

Výluh č. II				
Navážka drogy [g]/50ml	Zbytek po odpaření [mg]/0,250ml	A	AA [%]	Průměr [%]
0,5065	0,70665	0,363	-	-
		0,337	7,1625	-
		0,193	46,8320	46,9237 ± 0,5659
		0,190	47,6580	
		0,195	46,2810	

AA 7,1625 % odpovídá proužku, kde přišel silikagel do kontaktu pouze s vyvíjecí soustavou; Absorbance 0,363 odpovídá roztoku DPPH v methanolu

3. Navážka drogy 0,5016g  
 Navážce drogy 0,5053g odpovídá 0,14125g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,5016g odpovídá 0,14022g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,5016g odpovídá **0,7011mg** odparku/0,250ml

**Tab. 10c: Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu - methanolvý extrakt (sběr Zahorie)**

Výluh č. III				
Navážka drogy [g]/50ml	Zbytek po odpaření [mg]/0,250ml	A	AA [%]	Průměr [%]
0,5016	0,7011	0,369	-	-
		0,340	7,8591	-
		0,206	44,1734	44,0831 ± 0,7771
		0,203	44,9864	
		0,210	43,0894	

AA 7,8591 % odpovídá proužku, kde přišel silikagel do kontaktu pouze s vyvíjecí soustavou; Absorbance 0,369 odpovídá roztoku DPPH v methanolu

### 6.1.6.3 Vodný extrakt (sběr Komárno):

- Navážka drogy 0,5007g
- Hmotnost odparku 0,0058g/2ml extraktu  
Hmotnost odparku 0,1450g/50ml extraktu  
Navážce drogy 0,5007g odpovídá 0,1450g odparku/50ml

1. Navážka drogy 0,5001g  
Navážce drogy 0,5007g odpovídá 0,1450g odparku/50ml  
Navážce drogy 0,5001g odpovídá 0,14483g odparku/50ml  
Navážce drogy 0,5001g odpovídá **0,72415mg** odparku/0,250ml

**Tab. 11a: Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu - vodný extrakt (sběr Komárno)**

Výluh č. I				
Navážka vzorku [g]/50ml	Zbytek po odpaření [mg]/0,250ml	A	AA [%]	Průměr [%]
0,5001	0,72415	0,355	-	-
		0,324	8,7324	-
		0,258	27,3239	27,6056 ± 0,2300
		0,257	27,6056	
		0,256	27,8873	

AA 8,7324 % odpovídá proužku, kde přišel silikagel do kontaktu pouze s vyvíjecí soustavou; Absorbance 0,355 odpovídá roztoku DPPH v methanolu

2. Navážka drogy 0,5040g  
 Navážce drogy 0,5007g odpovídá 0,1450g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,5040g odpovídá 0,14596g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,5040g odpovídá **0,7298mg** odparku/0,250ml

**Tab. 11b: Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu - vodný extrat (sběr Komárno)**

Výluh č. II				
Navážka vzorku [g]/50ml	Zbytek po odpaření [mg]/0,250ml	A	AA [%]	Průměr [%]
0,5040	0,7298	0,320	-	-
		0,294	8,1280	-
		0,229	28,4375	29,3750 ± 0,9200
		0,222	30,6250	
		0,227	29,0625	

AA 8,1280 % odpovídá proužku, kde přišel silikagel do kontaktu pouze s vyvíjecí soustavou; Absorbance 0,320 odpovídá roztoku DPPH v methanolu

3. Navážka drogy 0,5003g  
 Navážce drogy 0,5007g odpovídá 0,1450g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,5003g odpovídá 0,14488g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,5003g odpovídá **0,7244mg** odparku/0,250ml

**Tab. 11c: Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu - vodný extrat (sběr Komárno)**

Výluh č. III				
Navážka vzorku [g]/50ml	Zbytek po odpaření [mg]/0,250ml	A	AA [%]	Průměr [%]
0,5003	0,7244	0,320	-	-
		0,294	8,1250	-
		0,233	27,1875	27,0833 ± 0,6421
		0,236	26,2500	
		0,231	27,8125	

AA 8,1250 % odpovídá proužku, kde přišel silikagel do kontaktu pouze s vyvíjecí soustavou; Absorbance 0,320 odpovídá roztoku DPPH v methanolu

#### 6.1.6.4 Vodný extrakt (sběr Zahorie)

- Navážka vzorku 0,5035g
- Hmotnost odparku 0,00615g/2ml extraktu  
Hmotnost odparku 0,15375g/50ml extraktu  
Navážce drogy 0,5035g odpovídá 0,15375g odparku/50ml
- 1. Navážka drogy 0,5065g  
Navážce drogy 0,5035g odpovídá 0,15375g odparku/50ml  
Navážce drogy 0,5065g odpovídá 0,15470g odparku/50ml  
Navážce drogy 0,5065g odpovídá **0,7735mg** odparku/0,250ml

**Tab. 12a: Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu - vodný extrakt (sběr Zahorie)**

Výluh č. I				
Navážka drogy [g]/50ml	Zbytek po odpaření [mg]/0,250ml	A	AA [%]	Průměr [%]
0,5066	0,7735	0,306	-	-
		0,254	16,9935	-
		0,191	37,5817	38,7800 ± 1,0784
		0,188	38,5621	
		0,183	40,1961	

AA 16,9935 % odpovídá proužku, kde přišel silikagel do kontaktu pouze s vyvíjecí soustavou; Absorbance 0,306 odpovídá roztoku DPPH v methanolu

2. Navážka drogy 0,5030g  
 Navážce drogy 0,5035g odpovídá 0,15375g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,5030g odpovídá 0,15360g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,5030g odpovídá **0,7680mg** odparku/0,250ml

**Tab. 12b: Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu - vodný extrakt (sběr Zahorie)**

Výluh č. II				
Navážka drogy [g]/50ml	Zbytek po odpaření [mg]/0,250ml	A	AA [%]	Průměr [%]
0,5030	0,7680	0,308	-	-
		0,255	17,2078	-
		0,200	35,0649	36,1472 ± 0,8099
		0,196	36,3636	
		0,194	37,0130	

AA 17,2078 % odpovídá proužku, kde přišel silikagel do kontaktu pouze s vyvíjecí soustavou; Absorbance 0,308 odpovídá roztoku DPPH v methanolu

3. Navážka drogy 0,5066g  
 Navážce drogy 0,5035g odpovídá 0,15375g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,5066g odpovídá 0,15470g odparku/50ml  
 Navážce drogy 0,5066g odpovídá **0,7735mg** odparku/0,250ml

**Tab. 12c: Stanovení antiradikálové aktivity hyperosidu - vodný extrakt (sběr Zahorie)**

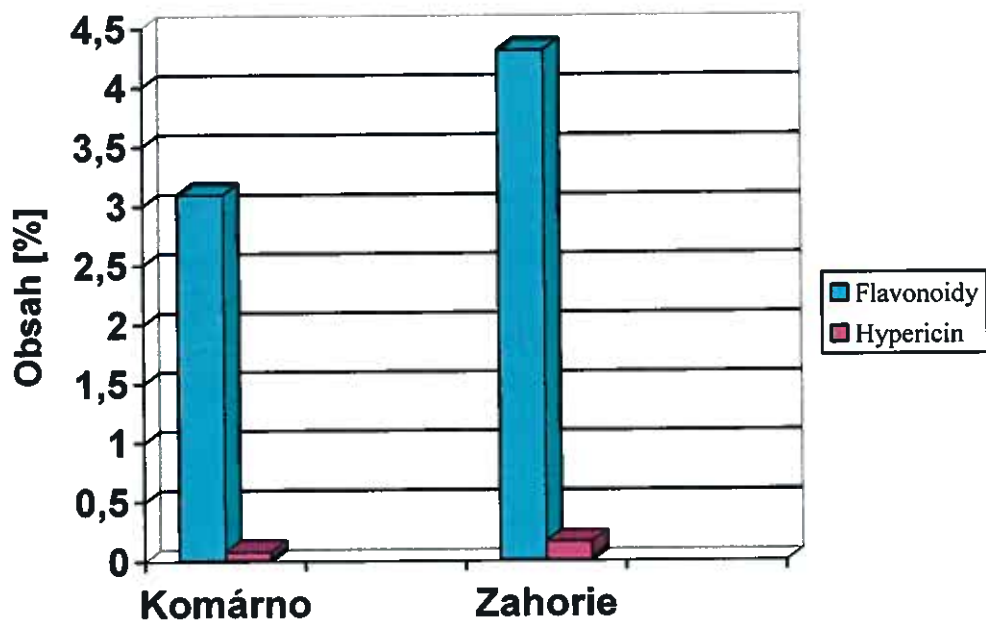
Výluh č. III				
Navážka drogy [g]/50ml	Zbytek po odpaření [mg]/0,250ml	A	AA [%]	Průměr [%]
0,5066	0,7735	0,308	-	-
		0,255	17,2078	-
		0,184	40,2597	38,5281 ± 1,2528
		0,193	37,3377	
		0,191	37,9870	

AA 17,2078 % odpovídá proužku, kde přišel silikagel do kontaktu pouze s vyvíjecí soustavou; Absorbance 0,308 odpovídá roztoku DPPH v methanolu

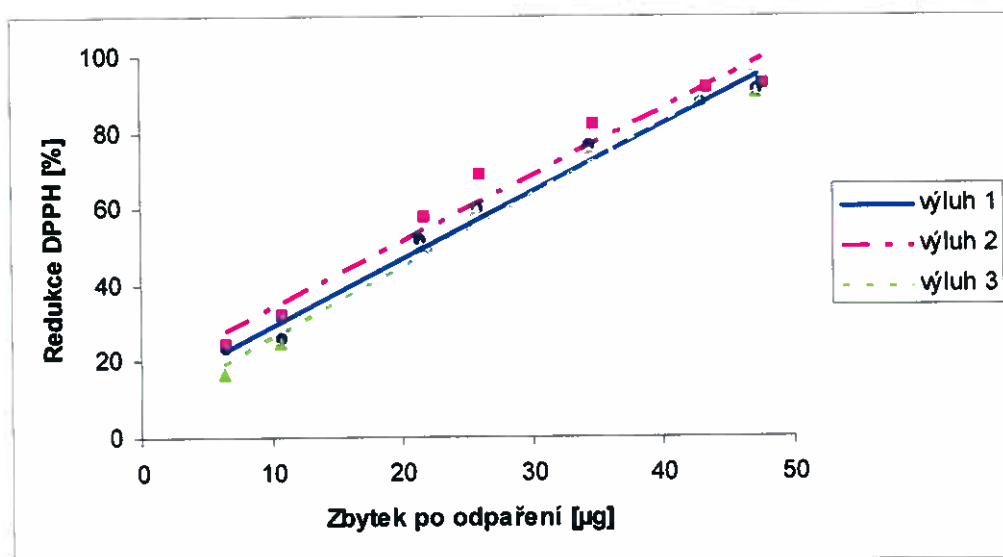


## 6.2 GRAFICKÉ ZNÁZORNĚNÍ

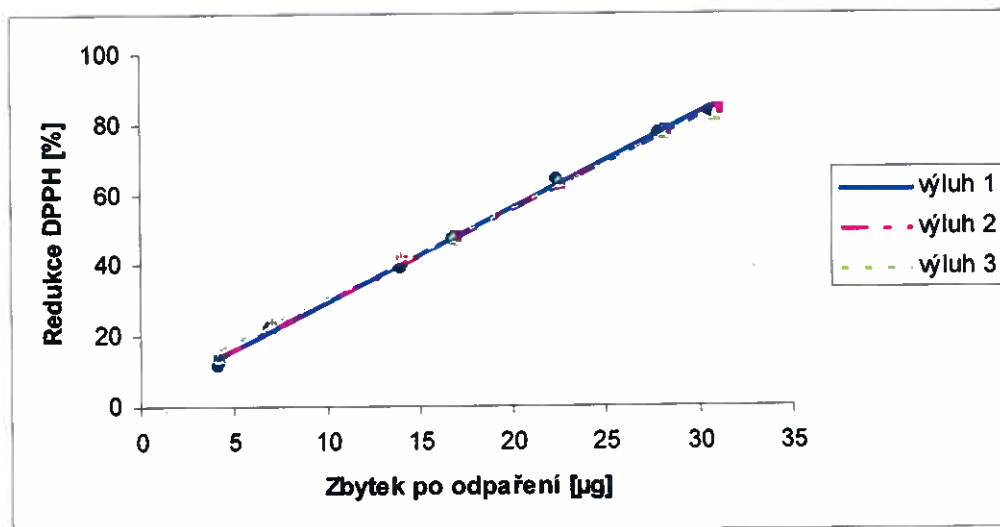
Graf č. 1 Obsah flavonoidů a hypericinu v droze různého původu



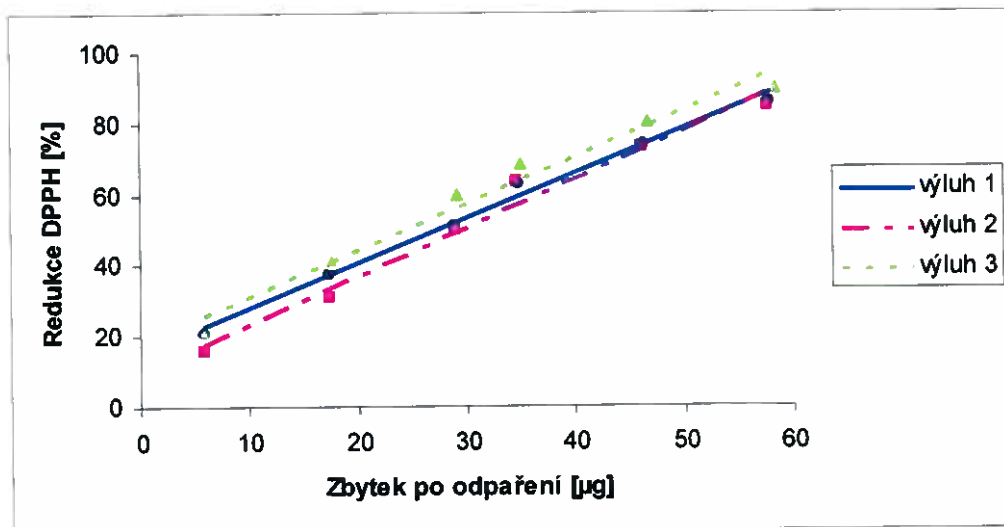
Graf č. 2 Závislost AA na množství extraktu (vzorek Komárno, methanolový výluh)



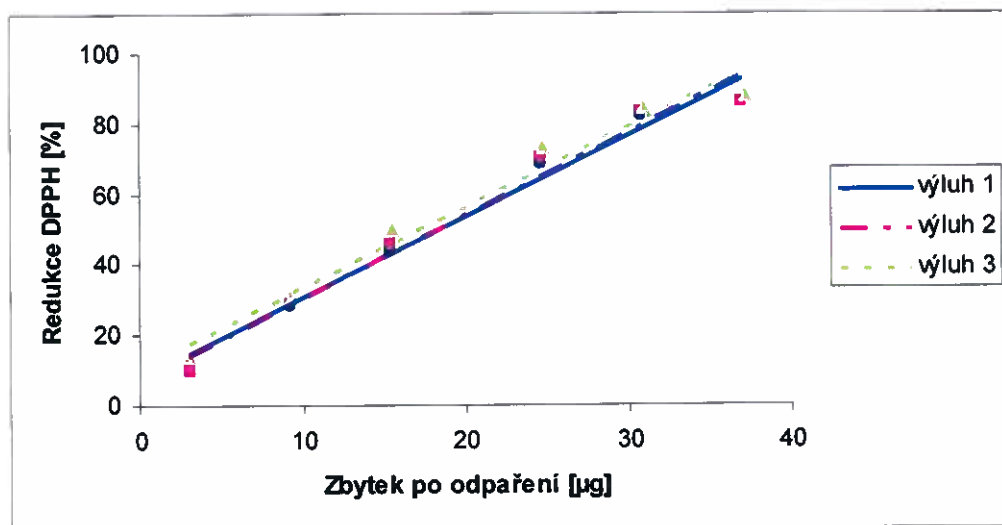
Graf č. 3 Závislost AA na množství extraktu (vzorek Zahorie, metanolový výluh)



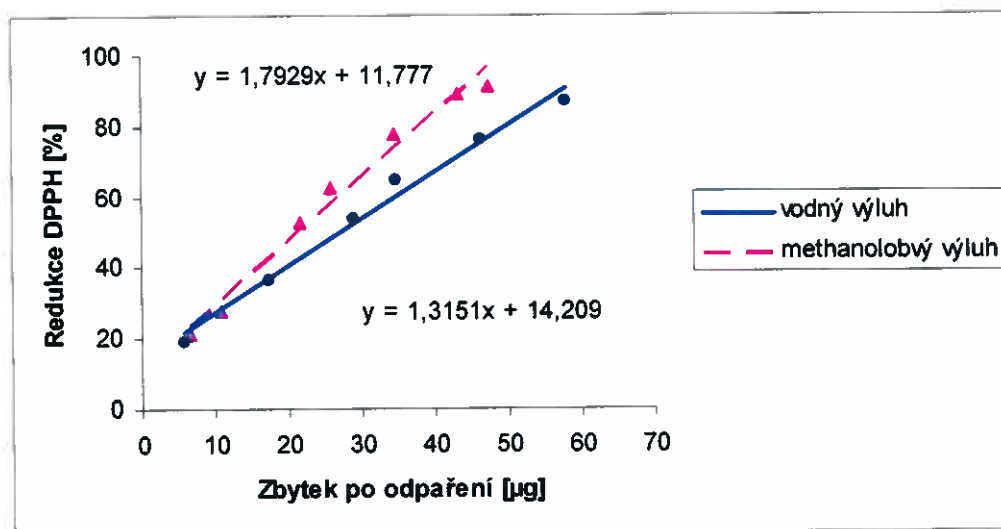
Graf č. 4 Závislost AA na množství extraktu (vzorek Komárno, vodný výluh)



Graf č. 5 Závislost AA na množství extraktu (vzorek Zahorie, vodný výluh)



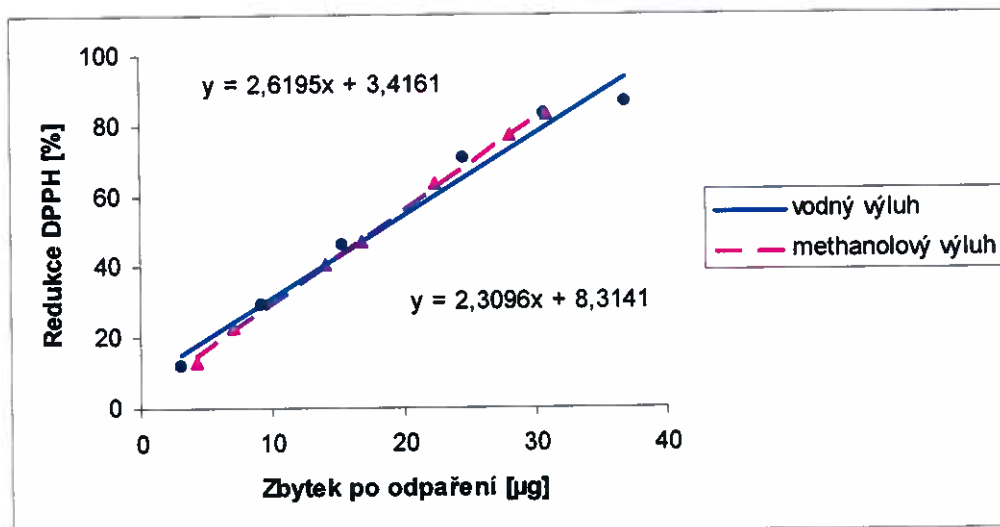
Graf č. 6 Antioxidační aktivita extraktů HP sběr Komárno



$IC_{50}$  (methanolový extrakt) = 21,3191 µg

$IC_{50}$  (vodný extrakt) = 27,2154 µg

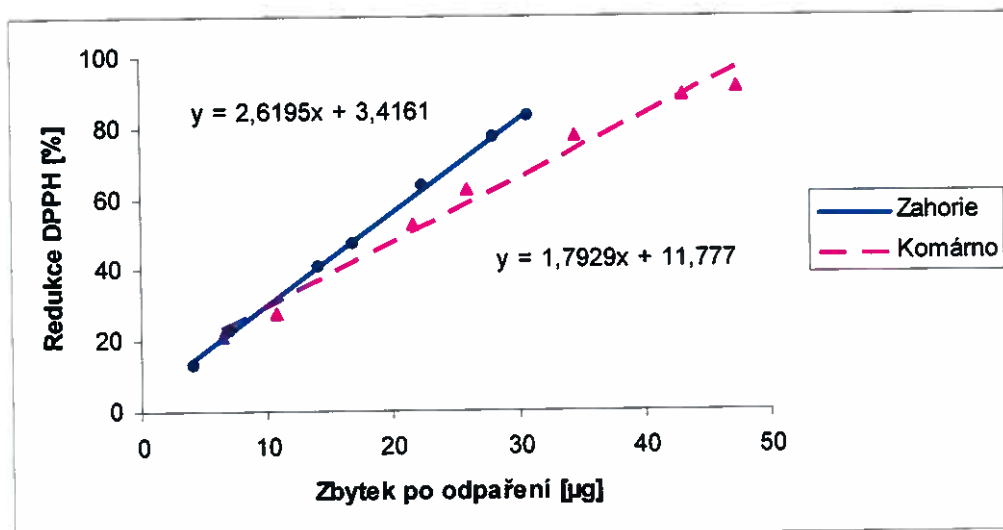
Graf č. 7 Antioxidační aktivita extraktů HP sběr Zahorie



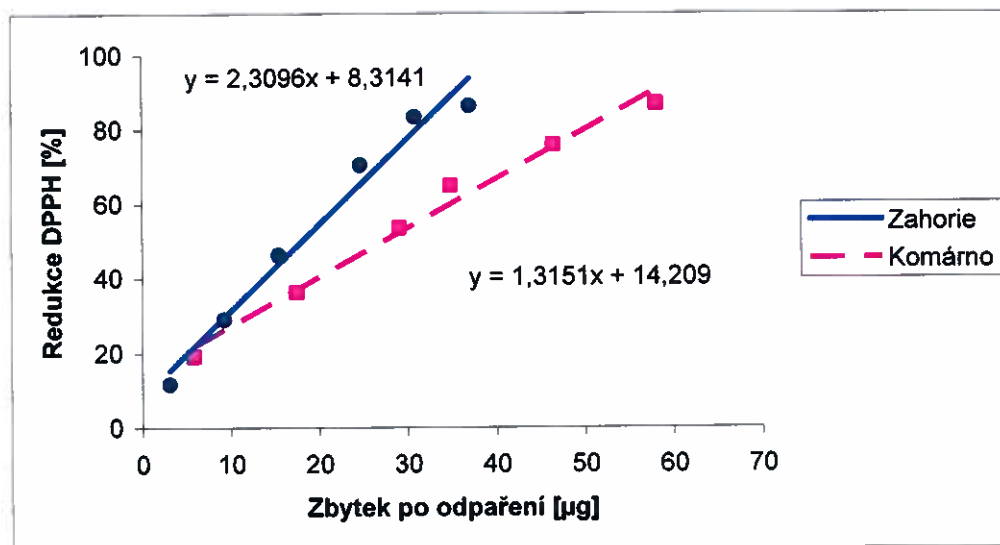
$IC_{50}$  (methanolvý extrakt) = 17,7835 µg

$IC_{50}$  (vodný extrakt) = 18,0490 µg

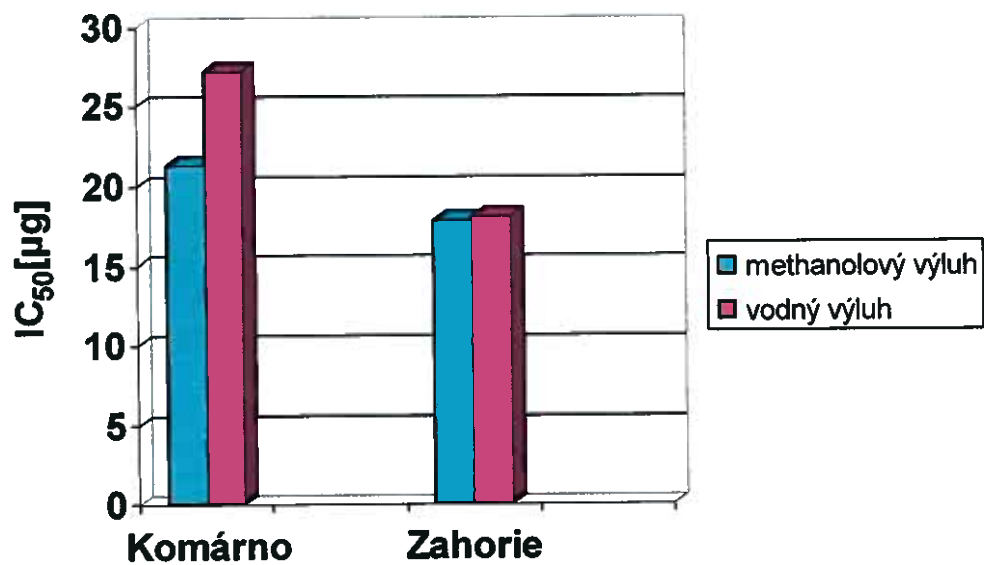
Graf č. 8 Porovnání antioxidační aktivity methanolvých extraktů drogy různého původu



Graf č. 9 Porovnání antioxidační aktivity vodných extraktů drogy různého původu



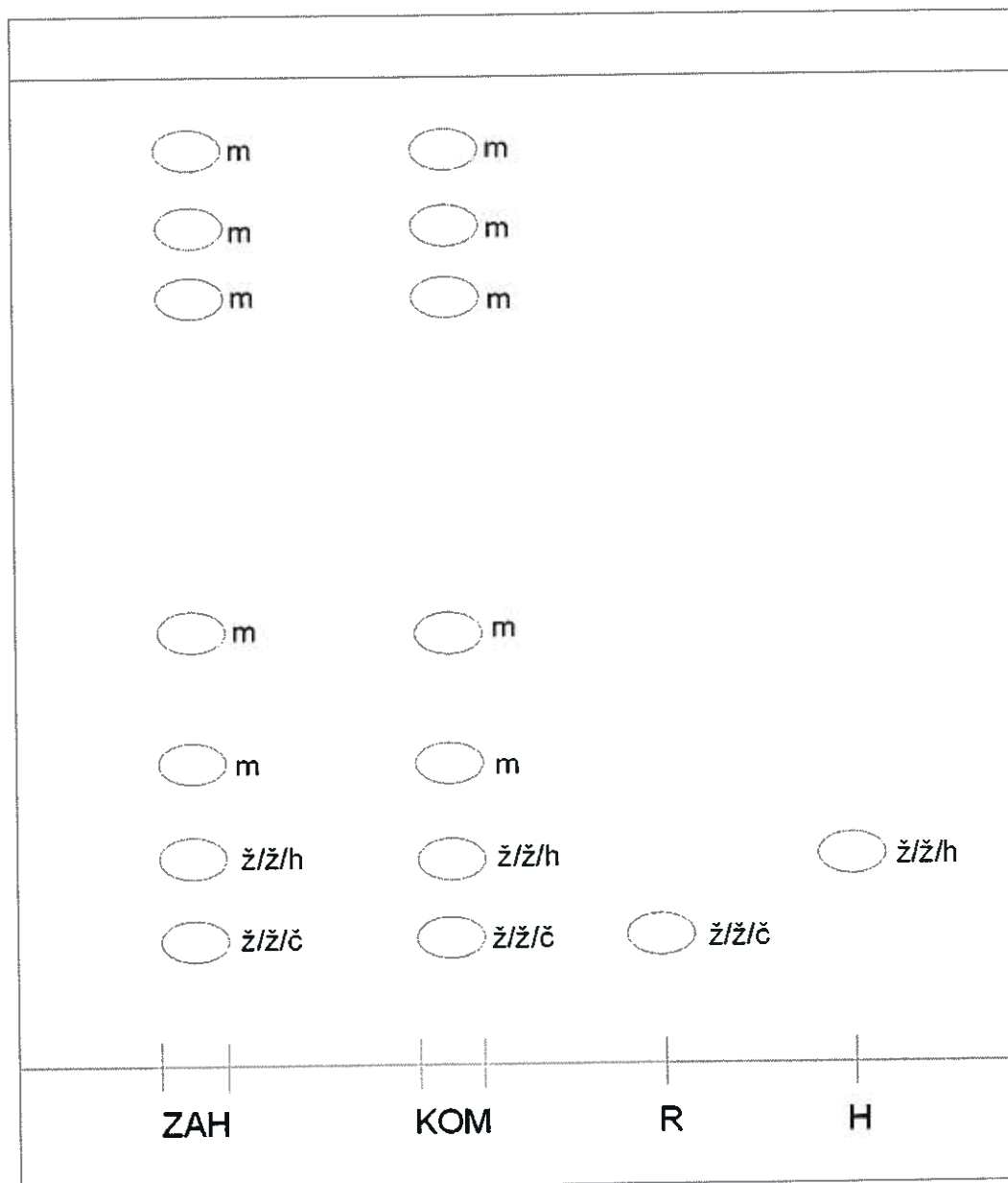
Graf č. 10 Srovnání antiadikálové aktivity extraktů drogy



## 6.3 TLC

**Obr. č. 1** Schéma chromatogramu – důkaz flavonoidů (soustava ethylacetát + kyselina mravenčí + voda; 90 + 6 + 9)

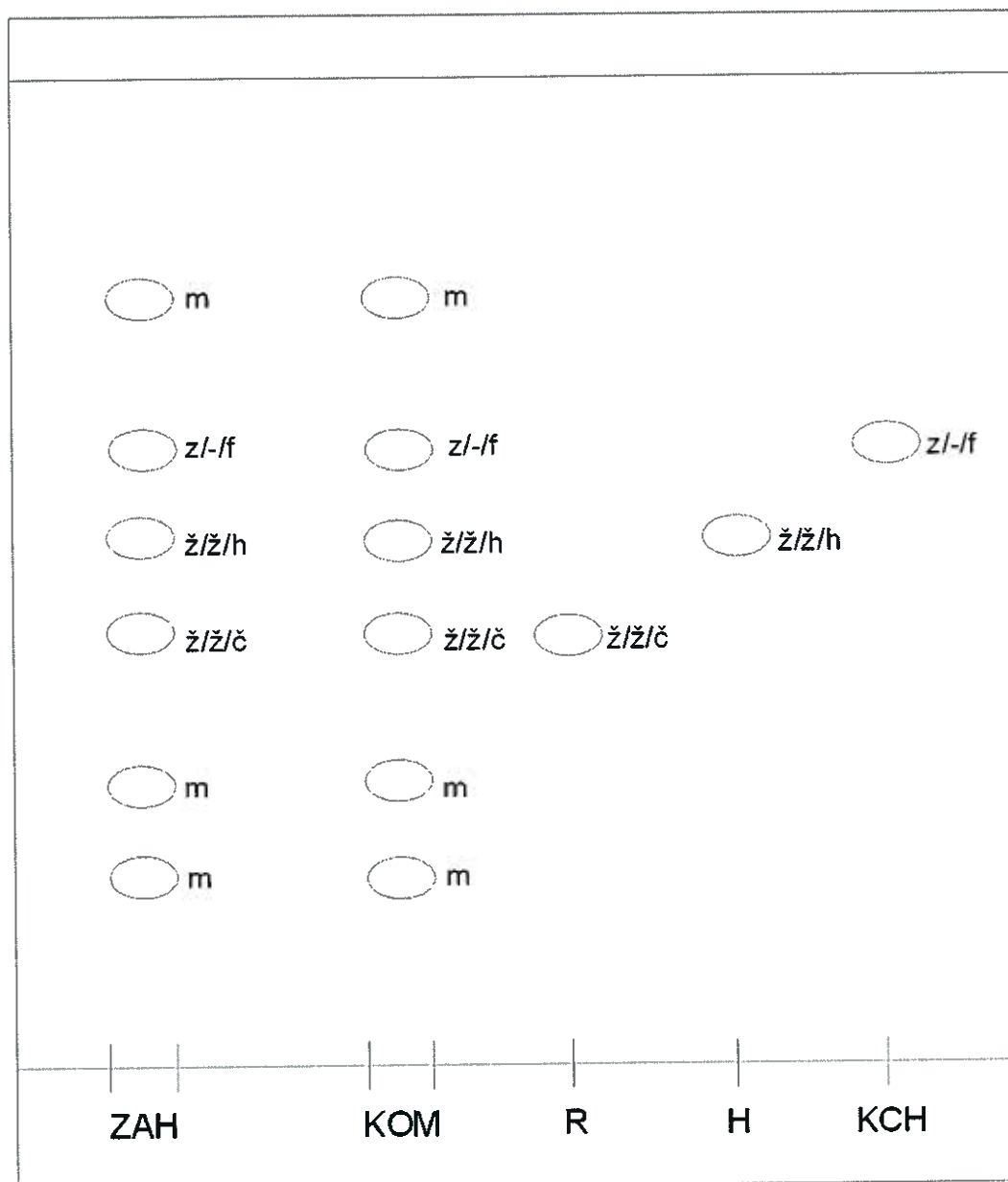
Detekce: Naturstoffreagens (UV) / DPPH / denní světlo (po postřiku Naturstoffreagens)



ž (žlutá)  
h (hnědá)  
č (červenohnědá)  
m (modrá)

ZAH (Zahorie)  
KOM (Komárno)  
R (rutin)  
H (hyperosid)

**Obr. č. 2** Schéma chromatogramu – důkaz flavonoidů (soustava ethylacetát + kyselina mravenčí + voda + butanon; 50 + 10 + 10 + 30)  
 Detekce: Naturstoffreagens (UV) / DPPH / denní světlo (po postřiku Naturstoffreagens)



ž (žlutá)  
 h (hnědá)  
 č (červenohnědá)  
 z (zelená)  
 f (fialová)  
 m (modrá)

ZAH (Zahorie)  
 KOM (Komárno)  
 R (rutin)  
 H (hyperosid)  
 KCH (kyselina chlorogenová)

## 7 DISKUSE

*Hypericum perforatum* je léčivá rostlina, která má široké využití v léčbě středních a mírných depresí. Dokonce by mohla být v některých případech upřednostňována před syntetickými antidepresivy, protože se předpokládá, že má mnohem méně vedlejších nežádoucích účinků a pacienti ji lépe snášejí. (27, 34, 47)

Je známo i mnoho dalších indikací, pro které se tato rostlina využívá a v nejbližší době se nejspíše budou objevovat nové a nové cesty využití, protože o *Hypericum perforatum* je dnes velký zájem a provádí se velké množství výzkumů a studií o jejích účincích.

V posledních letech se objevuje hodně zpráv o antioxidačních účincích HP a o jejím využití v oblastech, které toto působení mohou využít. Důležité pro antioxidační působení je patrně zastoupení fenolických sloučenin a flavonoidů. Tyto látky jsou nejspíše zodpovědné za antioxidační účinky.

Antioxidanty tvoří různorodou skupinu látek. Tyto látky působí proti volným radikálům, mohou bránit jejich vzniku, likvidovat již vzniklé volné radikály nebo opravovat či eliminovat molekuly, které jsou poškozené působením volných radikálů. (12, 13)

Existuje několik metod, které se využívají ke stanovení antioxidační aktivity. Patří k nim jednak metody založené na hodnocení eliminace radikálů (syntetických, kyslíkových radikálů či lipidová peroxidace) a dále metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek (metody chemické a elektrochemické). Mezi velmi často používané metody patří metoda využívající DPPH.

Tu jsem také využila pro svou práci. Zjišťovala jsem antioxidační aktivitu dvou vzorků *Hypericum perforatum* získaných ze dvou různých lokalit ze Slovenska. U každého vzorku jsem hodnotila dva různé extrakty, a to methanolový a vodný. Je velký rozdíl, jestli se jako extrakční činidlo použije methanol či voda. Do methanolu se extrahovaly látky vykazující vyšší antioxidační aktivitu než do vody, i když extrakce probíhala za stejných podmínek. Výběr extrakčního činidla je tedy velmi důležitý. V mnoha pracích, které se zabývají problematikou antioxidační aktivity, se jako extrakční činidla využívají organická rozpouštědla jako je methanol, ethanol, ethylacetát a další. Vodné extrakty se testují mnohem méně. Ale



není důležitý jen výběr extrakčního činidla, ale i metoda, která je pro měření antioxidační aktivity použita. Komplexně by se měl brát v úvahu charakter obsahových látek v droze, výběr vhodné metody a extrakčního činidla ke stanovení antioxidační aktivity.

Jung a kol. (54) zkoumali antioxidační aktivitu u listů ženšenu. Použili vodné, methanolové a ethanolové extrakty. Ethanolový extrakt prokázal nejvyšší aktivitu ve zhášení DPPH radikálu a hydroxylového radikálu. Na druhé straně nejvyšší aktivitu ve zhášení superoxidového radikálu vykazoval vodný extrakt, následovaný ethanolovým a methanolovým. A právě z rozdílů v koncentraci klíčových antioxidantů v extraktech získaných různými rozpouštědly vyplývá i jejich odlišná antioxidační aktivita.

Ze stanovení obsahu flavonoidů a hypericinu (graf č.1) vyplývá, že droga z oblasti Zahorie obsahuje více účinných látek než droga z oblasti Komárno. Jelikož flavonoidy jsou látky, které mají antioxidační potenciál, předpokládá se, že droga z oblasti Zahorie bude vykazovat i vyšší antioxidační aktivitu (graf č. 8 a graf č.9).

Při stanovení antioxidační aktivity záleží jednak na obsahu aktivních sloučenin, což může být ovlivněno různými faktory, ale neméně důležitý je i výběr extrakčního činidla. Antioxidační aktivita vodného extraktu drogy byla nepatrně nižší než methanolového (graf č.10). Do methanolu přešlo pravděpodobně více látek s AA.

U hlavního flavonoidu v extraktech – hyperosidu byla jeho antioxidační aktivita potvrzena stanovením po jeho semipreparativní izolaci z extraktů z drog. Hyperosid přechází do extraktu methanolového i vodného. Vyšší množství hyperosidu soudě podle vyšší zhášecí aktivity bylo ve vzorcích z oblasti Zahorie.

Kromě vlastního stanovení antioxidační aktivity jsem hodnotila kvalitu drogy stanovením obsahu flavonoidů a hypericinu. Při stanovení obsahu flavonoidů jsem zvolila spektrofotometrické stanovení produktů reakce s kyselinou boritou a kyselinou šťavelovou (postup dle ČL 2002, článek *Crataegi folium cum flore*). Lékopis nehodnotí kvalitu drogy podle obsahu flavonoidů. Literatura uvádí u *Hyperici herba* obsah flavonoidů mezi 2–4%. (28, 32) Obsah flavonoidů ve vzorku Komárno byl  $3,0961 \pm 0,0227\%$  a ve vzorku Zahorie byl  $4,3091 \pm 0,0251\%$ .

Kvalita drogy je posuzována podle obsahu hypericinu. Prováděla jsem jej dle ČL 2002 článku *Hyperici herba*, který požaduje nejméně 0,08% všech hypericinů,

počítáno jako hypericin. Vzorek z oblasti Zahorie obsahující  $0,1571 \pm 0,0021\%$  hypericinů vyhovuje požadavkům lékopisu, kdežto vzorek z oblasti Komárno obsahující  $0,0774 \pm 0,0054\%$  hypericinů požadavkům lékopisu nevyhovuje.

Je známo, že různé časové i místní podmínky sběru mohou mít podstatný vliv na kvantitativní zastoupení účinných látek. Velmi důležitým faktorem z hlediska množství a vzájemného poměru obsahových látek v HP jsou klimatické podmínky (a s tím související genetická variabilita), ve kterých tato rostlina roste. (55) Je také rozdíl, jestli je rostlina pěstována na poli nebo ve skleníku. Jedná se o dost rozdílné prostředí a může vést k velkým rozdílům v koncentraci obsahových látek. (56) Neméně důležitým faktorem je i vývojové stadium, ve kterém je rostlina sbírána. (56, 57) Hodně záleží na tom, jestli je sběr prováděn ve vegetativním stadiu, stadiu kvetení či jiném.

## 8 ZÁVĚR

- 1) Byl vypracován přehled o možnostech sledování antiraikálové aktivity.
- 2) Byl vypracován přehled o biologických účincích a využití *Hypericum perforatum*.
- 3) Byl zjištěn obsah flavonoidů a hypericinu u drog *Hyperici herba* ze dvou lokalit. Vzorek z oblasti Komárno obsahuje 3,0961% flavonoidů a 0,0774% hypericinu. Vzorek z oblasti Zahorie obsahuje 4,3091% flavonoidů a 0,1571% hypericinu.
- 4) Metodou využívající DPPH radikál byla stanovena AA jednotlivých extraktů a vypočítána hodnota  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  methanolového extraktu drogy z oblasti Komárno je 21,3191  $\mu\text{g}$  a z oblasti Zahorie je 17,7835  $\mu\text{g}$ .  $IC_{50}$  vodného extraktu drogy z oblasti Komárno je 27,2154  $\mu\text{g}$  a z oblasti Zahorie je 18,0490  $\mu\text{g}$ .
- 5) Byla stanovena AA hyperosidu po semipreparativní TLC. Vyšší množství hyperosidu soudě podle vyšší zhášecí aktivity bylo ve vzorcích z oblasti Zahorie.

## 9 LITERATURA

1. Morillas-Ruiz, J. M., Villegas García, J. A., López, F. J., et al.: EFFECTS OF POLYPHENOLIC ANTIOXIDANTS ON EXERCISE - INDUCED OXIDATIVE STRESS, *Clin. Nutr.*, 2006. (v tisku)
2. Slanina, J., Táborská, E.: PŘÍJEM, BIOLOGICKÁ DOSTUPNOST A METABOLISMUS ROSTLINNÝCH POLYFENOLŮ U ČLOVĚKA, *Chem. Listy*, 2004; 98, 239-245.
3. Aaby, K., Hvattum, E., Skrede, G.: ANALYSIS OF FLAVONOIDS AND OTHER PHENOLIC COMPOUNDS USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH COULOMETRIC ARRAY DETECTION: RELATIONSHIP TO ANTIOXIDANT ACTIVITY, *J. Agric. Food Chem.*, 2004;28, 4595-4603.
4. Michels, G., Haenen, G. R. M. M., Wätjen, W., et al.: THE THIOL REACTIVITY OF THE OXIDATION PRODUCT OF 3,5,7-TRIHYDROXY-4H-CHROMEN-4-ONE CONTAINING FLAVONOIDS, *Toxicol. Lett.*, 2004; 151, 105-111.
5. Kim, J. D., Liu, L., Guo, W., et al.: CHEMICAL STRUCTURE OF FLAVONOLS IN RELATION TO MODULATION OF ANGIOGENESIS AND IMMUNE-ENDOTHELIAL CELL ADHESION, *J. Nutr. Biochem.*, 2006; 17, 165-176.
6. Williams, R. J., Spencer, J. P. E., Rice-Evans, C.: FLAVONOID: ANTIOXIDANTS OR SIGNALLING MOLECULES?, *Free Rad. Biol. Med.*, 2004; 36, 838-849.
7. Čepička, J., Karabín, M.: POLYFENOLOVÉ LÁTKY PIVA – PŘIROZENÉ ANTIOXIDANTY, *Chem. Listy*, 2002; 96, 90-95.
8. Kim, D. O., Lee, C. Y.: COMPREHENSIVE STUDY ON VITAMIN C EQUIVALENT ANTIOXIDANT CAPACITY (VCEAC) OF VARIOUS POLYPHENOLOCS IN SCAVENGING A FREE RADICAL AND ITS STRUCTURAL RELATIONSHIP, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2004; 44, 253-273.

9. Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., et al.: EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FLAVONOIDS BY „FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER“ ASSAY AND CYCLIC VOLTAMMETRY, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005; 1721, 174-184.
10. Cai, Y. Z., Sun, M., X, J., et al.: STRUCTURE – RADICAL SCAVENGING ACTIVITY RELATIONSHIP OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM TRADITIONAL CHINESE MEDICINAL PLANTS, *Life Sci.*, 2005. (v tisku)
11. Di Majo, D., Giammanco, M., La Guardia, M., et al.: FLAVANONES IN CITRUS FRUIT: STRUCTURE – ANTIOXIDANT ACTIVITY RELATIONSHIP, *Food Res. Int.*, 2005; 38, 1161-1166.
12. Štípek, S., et al.: ANTIOXIDANTY A VOLNÉ RADIKÁLY VE ZDRAVÍ A NEMOCI. 1. vyd. Praha, Grada Publishing, 2000.
13. Racek, J.: OXIDAČNÍ STRES A MOŽNOSTI JEHO OVLIVNĚNÍ. 1. vyd. Praha, Galén, 2003.
14. Youngson, R.: ANTIOXIDANTY - CESTA KE ZDRAVÍ. 1. vyd. Brno, Jota, 1995.
15. Benedí, J., Arronyo, 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.
16. Zou, Y., Lu, Y., Wei, D.: ANTIOXIDANT ACTIVITY OF A FLAVONOID-RICH EXTRACT OF *HYPERICUM PERFORATUM* L. *IN VITRO*, *J. Agric. Food Chem.*, 2004; 52, 5032-5039.
17. Silva, B. A., Ferreres, F., Malva, J. O., et al.: PHYTOCHEMICAL AND ANTIOXIDANT CHARACTERIZATION OF *HYPERICUM PERFORATUM* ALCOHOLIC EXTRACTS, *Food Chem.*, 2004; 90, 157-167.
18. Masuda, T., Inaba, Y., Maekawa, T., et al.: SIMPLE DETECTION METHOD OF POWERFUL ANTIRADICAL COMPOUNDS IN THE RAW EXTRACTS OF PLANTS AND ITS APPLICATION FOR THE IDENTIFICATION OF ANTIRADICAL PLANT CONSTITUENTS, *J. Agric. Food Chem.*, 2003; 51, 1831-1838.

19. Paulová, H., Bochořáková, H., Táborská, E.: METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK *IN VITRO*, Chem. Listy, 2004; 98, 174-179.
20. Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., et al.: ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SOME ALGERIAN MEDICINAL PLANTS EXTRACTS CONTAINING PHENOLIC COMPOUNDS, Food Chem., 2006; 97, 654-660.
21. Arts, M. J. T. J., Haenen, G. R. M. M., Voss, H-P. et al.: ANTIOXIDANT CAPACITY OF REACTION PRODUCT LIMITS THE APPLICABILITY OF THE TROLOX EQUIVALENT ANTIOXIDANT CAPACITY (TEAC) ASSAY, Food Chem. Tox., 2004; 42, 45-49.
22. Psotová, J., Lasovský, J., Vičar, J.: METAL-CHELATING PROPERTIES, ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR, SCAVENGING AND CYTOPROTECTIVE ACTIVITIES OF SIX NATURAL PHENOLICS, Biomed. Pap., 2003; 147, 147-153.
23. Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., et al.: ANTIOXIDANT ACTIVITY AND FREE RADICAL SCAVENGING CAPACITY BETWEEN KOREAN MEDICINAL PLANTS AND FLAVONOIDS BY ASSAY – GUIDED COMPARISON, Plant Sci., 2002; 1161-1168.
24. Tripathi, R., Mohan, H., Kamat, J. P.: MODULATION OF OXIDATIVE DAMAGE NATURAL PRODUCTS, Food Chem., 2006. (v tisku)
25. Caillet, S., Yu, H., Lessad, S., et al.: FENTON REACTION APPLIED FOR SCREENING NATURAL ANTIOXIDANTS, Food Chem., 2005. (v tisku)
26. Štěbrová, D., Klejdus, B., Kramářová, E., et al.: STANOVENÍ HYPERICINU *IN VITRO* V TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH *HYPERICUM PERFORATUM* POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE, Chem. Listy, 2002; 96, 202-205.
27. Singh, Y. N.: POTENTIAL FOR INTERACTION OF KAVA AND ST. JOHN'S WORT WITH DRUGS, J. Ethnopharmacol., 2005; 100, 108-113.
28. Bruneton, J.: PHARMACOGNOSY PHYTOCHEMISTRY MEDICINAL PLANTS. 2<sup>nd</sup> ed. Paris, Lavoisier publishing, 1999, p. 440.
29. Silbernagl, S., Lang, F.: ATLAS PATOFYZIOLOGIE ČLOVĚKA. 1. vyd. Praha, Grada Publishing, 2001, s. 350.

30. Linde, K., Knüppel, L.: LARGE-SCALE OBSERVATIONAL STUDIES OF *HYPERICUM* EXTRACTS IN PATIENTS WITH DEPRESSIVE DISORDERS – A SYSTEMATIC REVIEW, *Phytomed.*, 2005, 12, 148-157.
31. Guilhermano, L. G., Ortiz, L., Ferigolo, M., et al.: COMMERCIALLY AVAILABLE *HYPERICUM PERFORATUM* EXTRACTS DO NOT DECREASE IMMOBILITY OF RATS IN THE FORCED SWIMMING TEST, *Prog. Neuro-Psychopharm. Biol. Psych.*, 2004; 28, 49-55.
32. Mennini, T., Gobbi, M.: THE ANTIDEPRESANT MECHANISM OF *HYPERICUM PERFORATUM*, *Life Sci.*, 2004; 75, 1021-1027.
33. Franklin, M., Reed, A., Murck, H.: SUB-CHRONIC TREATMENT WITH AN EXTRACT OF *HYPERICUM PERFORATUM* (ST JOHN'S WORT) SIGNIFICANTLY REDUCES CORTISOL AND CORTICOSTERONE IN THE RAT BRAIN, *Europ. Neuropsych.*, 2004; 14, 7-10.
34. Schroeder, C., Tank, J., Goldstein, D. S., et al.: INFLUENCE OF ST JOHN'S WORT ON CATECHOLAMINE TURNOVER AND CARDIOVASCULAR REGULATION IN HUMANS, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2004; 76, 480-489.
35. Trofimiuk, E., Walesiuk, A., Braszko, J. J.: ST JOHN'S WORT (*HYPERICUM PERFORATUM*) DIMINISHES COGNITIVE IMPAIRMENT CAUSED BY THE CHRONIC RESTRAINT STRESS IN RATS, *Pharm. Res.*, 2005; 51, 239-246.
36. Menegazzi, M., Di Paola, R., Mazzon, E., et al.: *HYPERICUM PERFORATUM* ATTENUATES THE DEVELOPMENT OF CARRAGEENAN-INDUCED LUG INJURY IN MICE, *Free Rad. Biol. Med.*, 2006; 40, 740-753.
37. Martarelli, D., Martarelli, B., Pediconi, D., et al.: *HYPERICUM PERFORATUM* METHANOLIC EXTRACT INHIBITS GROWTH OF HUMAN PROSTATIC CARCINOMA CELL LINE ORTHOTOPICALLY IMPLANTED IN NUDE MICE, *Cancer Lett.*, 2004; 210, 27-33.
38. Hosseinzadeh, H., Karimi, G-R., Rakhshanzadeh, M.: ANTICONVULSANT EFFECT OF *HYPERICUM PERFORATUM*: ROLE OF NITRIC OXIDE, *J. Ethnopharmacol.*, 2005; 98, 207-208.



39. Luo, L., Sun, Q., Mao, Y. Y., et al.: INHIBITORY EFFECT OF FLAVONOIDS FROM *HYPERICUM PERFORATUM* ON NITRIC OXIDE SYNTHASE, *J. Ethnopharmacol.*, 2004; 93, 221-225.
40. Lincová, D., Farghali, H., et al.: ZÁKLADNÍ A APLIKOVANÁ FARMAKOLOGIE. 1. vyd. Praha, Galén, 2002.
41. Dostálek, M., Pistovčáková, J., Juřica, J., et al.: EFFECT OF ST JOHN'S WORT (*HYPERICUM PERFORATUM*) ON CYTOCHROME P-450 ACTIVITY IN PERFUSED RAT LIVER, *Life Sci.*, 2005; 78, 239-244.
42. Donovan, J. L., Devane, C. L., Lewis, J. G., et al.: EFFECT 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, 901-906.
43. Murphy, P. A., Kern, S. E., Stanczyk, F. Z., et al.: INTERACTION OF ST JOHN'S WORT WITH ORAL CONTRACEPTIVES: EFFECT ON THE PHARMACOKINETICS OF NORETHINDRONE AND ETHINYLESTRADIOL, OVARIAN ACTIVITY AND BREAKTHROUGH BLEEDING, *Contracept.*, 2005; 71, 402-408.
44. Nacif Abreu, I., Porto, A. L. M., Marsaioli, A. J., et al.: DISTRIBUTION OF BIOACTIVE SUBSTANCES FROM *HYPRICUM BRASILIENSE* DURING PLANT GROWTH, *Plant Sci.*, 2004; 167, 949-954.
45. Mueller, S. C., Uehleke, B., Woehling, H., et al.: EFFECT OF ST JOHN'S WORT DOSE AND PREPARATIONS ON THE PHARMACOKINETICS OF DIGOXIN, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2004; 75, 546-557.
46. Traynor, N. J., Beattie, P. E., Ibbotson, S. H., et al.: PHOTOGENOTOXICITY OF HYPERICIN IN HACAT KERATINOCYTES: IMPLICATIONS FOR ST. JOHN'S WORT SUPPLEMENTS AND HIGH DOSE UVA-1 THERAPY, *Tox. Lett.*, 2005; 158, 220-224.
47. Petráňová, T.: TŘEZALKA TEČKOVANÁ (*HYPERICUM PERFORATUM*) – OBSTOJÍ ROSTLINNÉ ANTIDEPRESIVUM V KONKURENCI OSTATNÍCH ANTIDEPRESIV?, *Remedia*, 2003; 13, 57-59.



48. Gregoretta, B., Stebel, M., Candussio, L., et al.: TOXICITY OF *HYPERICUM PERFORATUM* (ST. JOHN'S WORT) ADMINISTERED DURING PREGNANCY AND LACTATION IN RATS, *Tox. Appl. Pharmacol.*, 2004; 200, 201-205.
49. Borges, L. V., do Carmo Cancino, J. C., Peters, V. M., et al.: DEVELOPMENT OF PREGNANCY IN RATS TREATED WITH *HYPERICUM PERFORATUM*, *Phytother. Res.*, 2005; 19, 885-887.
50. Mosaleeyanon, K., Zobayed, S. M. A., Afreen, F., et al.: RELATIONSHIP BETWEEN NET PHOTOSYNTHETIC RATE AND SECONDARY METABOLITE CONTENTS IN ST JOHN'S WORT, *Plant Sci.*, 2005; 169, 523-531.
51. Kiewert, C., Buchholzer, M. L., Hartmann, J., et al.: STIMULATION OF HIPPOCAMPAL ACETYLCHOLINE RELEASE BY HYPERFORIN, A CONSTITUENT OF ST JOHN'S WORT, *Neurosci. Lett.*, 2004; 364, 195-198.
52. Hubík, J., et al.: OBECNÁ FARMAKOGNOSIE II. 3. vyd. Praha, Státní pedagogické nakladatelství, 1989.
53. ČESKÝ LÉKOPIS 2002, Praha, Grada Publishing, 2002.
54. Jung, C. H., Seog, H. M., Choi, I. W., et al.: ANTIOXIDANT PROPERTIES OF VARIOUS SOLVENT EXTRACTS FROM WILD GINSENG LEAVES, *Food Sci. Technol.*, 2006; 39, 266-274.
55. Radusiene, J., Judzentiene, A., Bernotiene, G.: ESSENTIAL OIL COMPOSITION AND VARIABILITY OF *HYPERICUM PERFORATUM* L. GROWING IN LITHUANIA, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2005; 33, 113-124.
56. Couceiro, M. A., Afreen, F., Zobayed S. M. A., et al.: VARIATION IN CONCENTRATIONS OF MAJOR BIOACTIVE COMPOUNDS OF ST. JOHN'S WORT: EFFECT OF HARVESTING TIME, TEMPERATURE AND GERMPLASM, *Plant Sci.*, 2006; 170, 128-134.
57. Schwob, I., Bessiere, J. M., Masotti, V., et al.: CHANGES IN ESSENTIAL OIL COMPOSITION ON SAINT JOHN'S WORT (*HYPERICUM PERFORATUM* L.) AERIAL PARTS DURING ITS PHENOLOGICAL CYCLE, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2004; 735-745.