

Vývoj a validácia HPLC metódy pre stanovenie bioaktívnych látok v rastlinných extraktoch

Bc. Veronika Hanúsková

Diplomová práca
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Hanúsková**
Osobní číslo: **T14503**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení bioaktivních látek v rostlinných extraktech**

Zásady pro vypracování:

1. V teoretické části zpracujete literární rešerši na zadané téma. Charakterizujte bioaktivní látky přítomné v extraktech ze zvolených rostlin. Dále se zaměřte na získání informací o farmakologické účinnosti těchto látek. Věnujte se rovněž metodě vysokoúčinné kapalinové chromatografie a její validaci. Popište současný stav řešené problematiky.
2. V praktické části navrhnete HPLC metodu vhodnou pro stanovení bioaktivních látek přítomných ve vodných, alkoholických a glycerinových extraktech studovaných rostlin. Proveďte validaci této metody a bioaktivní látky v rostlinných extraktech kvantifikujte. Popište současný stav řešené problematiky.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. SNYDER L. R. at al.: Practical HPLC Method Development, Second Edition., John Wiley&Sons, Inc., 1997, ISBN: 978-0-471-00703-6.
2. PETERSON J. J. et al: Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature, Journal of Food Composition and Analysis 19 (2006) S74S80.
3. PIETTA P. Flavonoids as Antioxidants. J. Nat. Prod. 2000, vol. 63, s. 1035 – 1042.
4. ANDERSEN, Oyvind M a Kenneth R Markham. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. Boca Raton, FL: CRC, Taylor, 2006, 1237 p. ISBN 08-493-2021-6.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Věra Kašpárková, CSc.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2016

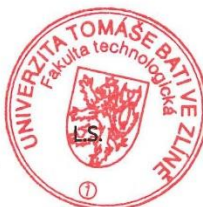
Termín odevzdání diplomové práce:

18. května 2016

Ve Zlíně dne 20. ledna 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: HANŮSKOVÁ VERONIKA

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně ...17.5.2016

..... Hanůsková

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

- (3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.
- ²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:
- (3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).
- ³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:
- (1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.
- (2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.
- (3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa zameriava na vývoj HPLC metódy pre stanovenie vybraných bioaktívnych látok z rastliných extraktov. Presnejšie sa práca zaoberá separáciou vybraných flavonoidov a to rutínu, hesperidínu, naringínu, fenolpropanoidov: dihydrokumarínu, eskulínu a escínu a derivátom antrachinónu hypericínu. Tieto látky pochádzajú z rastlín: Pagaštan konský (*Aesculus hippocastanum*), Pohánka tatárska (*Fagopyrum tataricum* (L.)), Komunica lekárska (*Melilotus officinalis* (L.)), Ľubovník bodkovaný (*Hypericum perforatum*) a Grep (*Citrus paradisi*). Pre toto stanovenie boli vyvinuté tri metódy. Metóda s gradientom bola použitá pre stanovenie rutínu, hesperidínu, naringínu, dihydrokumarínu a eskulínu. Escín a hypericín boli potom analyzované pomocou izokratických metód.

Kľúčové slová: rutín, hesperidín, naringín, dihydrokumarín, escín, hypericín, *Aesculus hippocastanum*, *Fagopyrum tataricum* (L.), *Melilotus officinalis* (L.), *Hypericum perforatum* a *Citrus paradisi*

ABSTRACT

This diploma thesis aims at the development of the HPLC method for identification and quantification of chosen bioactive substances from herbal extracts. More specifically, the thesis deals with the separation of particular flavonoids (rutin, hesperidin, naringin), phenylpropanoids (dihydrocoumarin, aesculin, aescin) and anthraquinone derivatives (hypericin). These substances originate from the following herbs: European horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum*), tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.)), yellow sweet clover (*Melilotus officinalis* (L.)), St John's wort (*Hypericum perforatum*) and grapefruit (*Citrus paradisi*). For the above-mentioned determination, three methods were developed. The gradient method was used in the identification and quantification of rutin, hesperidin, naringin, dihydrocoumarin and aesculin. Aescin and hypericin were then analyzed by means of isocratic methods.

Keywords: rutin, hesperidin, naringin, dihydrocoumarin, escin, hypericin, *Aesculus hippocastanum*, *Fagopyrum tataricum* (L.), *Melilotus officinalis* (L.), *Hypericum perforatum* and *Citrus paradisi*

Dovoľujem si poďakovať sa vedúcej diplomovej práce doc. Ing. Věře Kašpárkovej, CSc. za odbornú pomoc, trpezlivosť a cenné rady, ktoré mi poskytla pri jej vypracovaní. Tiež by som sa chcela poďakovať pani laborantke Lenke Plechačovej za jej pomoc a veľkú ochotu.

PodĎakovanie patrí aj firme Nobilis Tilia s. r. o. ktorá poskytla vzorky rastlinných extraktov. Diplomová práca bola podporená projektom Internej grantovej agentúry UTB IGA 20016/006.

Prehlasujem, že odovzdaná verzia bakalárskej/diplomovej práce a elektronická verzia nahraná do IS/STAG sú totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČASŤ	11
1 BIOAKTÍVNE LÁTKY	12
1.1 FLAVONOIDY.....	12
1.1.1 Rutín.....	14
1.1.2 Hesperidín	15
1.1.3 Naringín.....	16
1.1.4 Dihydrokumarín	16
1.1.5 Escín.....	17
1.1.6 Eskulín.....	18
1.1.7 Hypericín.....	18
2 HLAVNÉ ZDROJE ŠTUDOVANÝCH BIOAKTÍVNYCH LÁTOK A ICH FARMAKOLÓGICKÉ ÚČINKY	20
2.1 PAGAŠTAN KONSKÝ.....	20
2.1.1 Farmakologické účinky escínu.....	21
2.1.2 Farmakologické účinky eskulínu	22
2.2 POHÁNKA TATÁRSKA	23
2.2.1 Farmakologické účinky rutínu	23
2.3 KOMONICA LEKÁRSKA	25
2.3.1 Farmakologické účinky dihydrokumarínu	25
2.4 ĽUBOVNÍK BODKOVANÝ.....	26
2.4.1 Farmakologické účinky hypericínu.....	27
2.5 GREP	28
2.5.1 Farmakologické účinky naringínu.....	28
2.5.2 Farmakologické účinky hesperidínu	29
3 VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRÁFIA	31
3.1 INŠTRUMENTÁCIA HPLC	31
3.2 ZÁKLADNÉ CHROMATOGRAFICKÉ CHARAKTERISTIKY	32
3.2.1 Retenčný čas a objem.....	32
3.2.2 Počet teoretických poschodí.....	32
3.2.3 Retenčný faktor	33
3.2.4 Asymetria a rozlíšenie píkovo.....	33
3.3 VALIDÁCIA METÓD HPLC.....	34
3.3.1 Správnosť	34
3.3.2 Presnosť, opakovateľnosť a reprodukovateľnosť.....	35
3.3.3 Lineárnosť	35
3.3.4 Limit detekcie a stanoviteľnosti	35
3.3.5 Selektivita a špecifita	36
3.3.6 Robustnosť	36
3.4 VÝVOJ VALIDÁCIE	36
4 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	37
5 CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE	43
II PRAKTICKÁ ČASŤ	44

6	PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE A POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	45
6.1	PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE	45
6.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ŠTANDARDY	45
6.2.1	Štandardy.....	45
6.2.2	Vzorky.....	46
6.2.3	Chemikálie	46
6.3	PRÍPRAVA ROZTOKOV.....	46
6.3.1	Príprava roztokov pre kalibráciu a validáciu linearity	47
6.3.2	Príprava roztokov pre validáciu opakovateľnosti, presnosti a správnosti.....	47
6.3.3	Príprava roztoku z olejového extraktu ľubovníka.....	48
7	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	49
7.1	VÝVOJ METÓDY.....	49
7.2	VÝVOJ ANALYTICKEJ METÓDY PRE STANOVENIE HESPERIDÍNU, ESKULÍNU, NARINGÍNU, DIHYDROKUMARÍNU A RUTÍNU	49
7.3	VÝVOJ ANALYTICKEJ METÓDY PRE ESCÍN.....	54
7.4	VÝVOJ ANALYTICKEJ METÓDY PRE HYPERICÍN	55
7.5	OPTIMALIZÁCIA VLNOVEJ DĹŽKY	56
7.6	TEST VHODNOSTI CHROMATOGRAFICKÉHO SYSTÉMU.....	61
7.6.1	Test vhodnosti chromatografického systému.....	61
7.6.2	Počet teoretických poschodí.....	61
7.6.3	Asymetria píkov	61
7.6.4	Rozlíšenie píkov.....	62
7.7	VALIDÁCIA METÓD.....	62
7.7.1	Linearita	62
7.7.2	Opakovateľnosť.....	70
7.7.3	Presnosť.....	71
7.7.4	Správnosť	72
8	KVANTIFIKÁCIA.....	73
	ZÁVER	78
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	80
	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....	93
	ZOZNAM OBRÁZKOV	96
	ZOZNAM TABULIEK	98

ÚVOD

Chronické ochorenia sú najčastejšou príčinou úmrtí vo svete. V zozname vedú kardiovaskulárne choroby, následne rakovina, chronické ochorenie pľúc a *diabetes mellitus*. Štúdie ukázali priamu spojitosť cholesterolu z potravy a nasýtených tukov s týmito chorobami. Avšak bol skúmaný nielen dopad vysokého príjmu tukov z potravy, ale tiež prevencia týchto chronických ochorení. Konzumácia ovocia a zeleniny sa ukázala byť dobrým prostriedkom k udržiavaniu zdravého životného štýlu. Toto tiež viedlo k otázke, ktoré látky v ovocí a zelenine môžu byť zodpovedné za ochranné účinky. Štúdie *in vitro*, rovnako ako pokusy *in vivo* majú presvedčivé výsledky so zlúčeninami rastlinného pôvodu všeobecne známymi ako bioaktívne látky. [1, s. 8142]

Medzi bioaktívne látky patrí aj veľká skupina látok nazývané polyfenoly, ktorá sa delí na mnoho podskupín medzi nimi patria aj flavonoidy a fenolpropanoidy. Flavonoidy majú prospešné účinky na organizmus a to hlavne antialergické, protizápalové, antioxidačné a protivirové. K významným bioaktívnym látkam patrí aj hypericín, ktorý je derivátom antrachinónu. K jeho základným vlastnostiam patrí protinádorová a antivírusová aktivita.

Diplomová práca sa zaoberá vývojom metódy pre analýzu vybraných bioaktívnych látok a ich kvantitatívnym a kvalitatívnym stanovením. Skúmané boli rutín, hesperidín, naringín, dihydrokumarín, eskulín, escín a hypericín. Tieto látky boli analyzované v rastlinných extraktoch Pagaštanu konského (*Aesculus hippocastanum*), Pohánky tatárskej (*Fagopyrum tataricum* (L.)), Komunice lekárskej (*Melilotus officinalis* (L.)), Lubovníka bodkovaného (*Hypericum perforatum*) a Grepu (*Citrus paradisi*). Pre stanovenie bola využitá separačná metóda HPLC s UV-VIS a DAD detektorom.

I. TEORETICKÁ ČASŤ

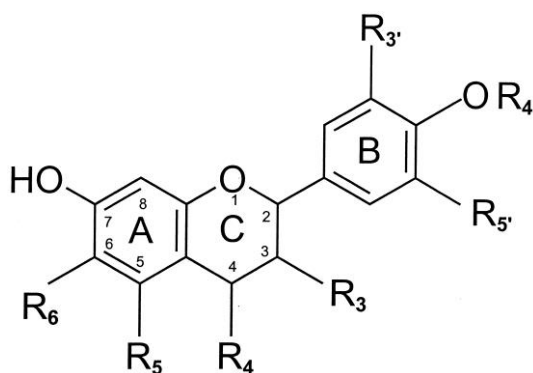
1 BIOAKTÍVNE LÁTKY

Bioaktívne látky sú sekundárne metabolity vyskytujúce sa v rastlinnej ríši a sú považované za nenutričné, ale životne dôležité ingrediencie pre udržiavanie ľudského zdravia. Medzi bioaktívne látky patrí aj skupina polyfenolov. Polyfenoly sú prirodzene sa vyskytujúce organické látky, ktoré majú vo svojej štruktúre aspoň jeden aromatický kruh, na ktorý je pripojená jedna alebo viac hydroxilových skupín. Akumulujú sa v rastlinách po rôznych biochemických procesoch ako napr. biosyntéza aromatických bielkovín (*šikimátová cesta, shikimate pathway*), ktorá vedie ku vzniku fenyylpropanoidov a kumarínov, alebo acetátová cesta, ktorá poskytuje najjednoduchšie fenoly a niekoľko chinónov. Okrem toho existuje ešte medziľahlá metabolická cesta, ktorej produktom sú flavonoidy, ktoré sú najdôležitejšou a početnou skupinou zlúčenín polyfenolov. Flavonoidy sú predmetom tejto práce. Presnejšie sa práca zaoberá vybranými flavonoidmi a to rutínom, hesperidínom, naringínom, fenolpropanoidmi: dihydrokumarínom, eskulínom a escínom a derivátom antrachinónu hypericínom. [1, s. 8142], [2, s. 58].

1.1 Flavonoidy

Flavonoidy sú sekundárne metabolity rastlín. Prvýkrát boli zaznamenané Robertom Boylem v roku 1664. Kvôli ich vlastnostiam boli nazvané ako “vitamín P“, neskôr bol tento názov zrušený. Flavonoidy sú zodpovedné za farby, chute a vône, rovnako ako lákanie alebo odpudzovanie hmyzu a mikroorganizmov. Sú výnimočné tým, že žiaden iný sekundárny metabolit nemá toľko kľúčových a rôznorodých rolí pri raste a vývoji rastlín. Flavonoidy sa obvykle nachádzajú v rastlinách vo forme *O*-glykozidov v ktorých je prítomná *D*-glukóza, *L*-rhamnosa, *D*-galaktóza, *L*-arabinóza, *D*-xylóza, *D*-apióza alebo *D*-glukurónová kyselina. Medzi rôznymi typmi rastlín, a dokonca aj medzi rôznymi časťami jednej rastliny existujú veľké rozdiely v zložení flavonoidov. Ich úlohou je chrániť rastlinu proti rôznymi biotickým a abiotickým stresom. Môžu mať napríklad funkciu ako antioxidanty, antimykotiká, fytoalexíny, či ako prostriedky pri ochrane proti byľinožravcom, patogénom alebo ultrafialovým žiarením. V potravinách rastlinného pôvodu bolo identifikovaných okolo 4000 rôznych flavonoidov. Najväčšiu pozornosť majú triedy flavonoidov s možným zdravotným prínosom (napr. flavonoly, flavóny, katechíny, flavanóny a antokyanidíny) [1, s. 8143], [3, s. 220, 223, 397, 398], [4, s. 482], [5, s. 303], [6, s. 192] [7, s. 199].

Flavonoidy sa z chemického hľadiska radia do podtriedy polyfenolov a ich základná chemická štruktúra je odvodená od difenylpropanu alebo fenylochromanu. Charakteristickú štruktúru možno vidieť na Obr. 1. Flavonoidy sú tvorené dvomi substituovanými benzénovými kruhmi (A,B), ktoré sú spojené trojuhľíkovým reťazcom, ktorý sa kombinuje s kyslíkom a dvoma atómami z benzénového kruhu (A) za tvorby tretieho, šesť až sedem členného kruhu (C). Na základe tejto štruktúry sa flavonoidy delia na podskupiny, vid' Tab. 1 podľa pripojenia kruhu B na kruh C; podľa oxidačného stavu a funkčných skupín na kruhu C [8, s. 3248], [9, s. 530], [10, s. 29].



Obr. 1. Všeobecná štruktúra flavonoidov a číslovanie [8, s. 3249]

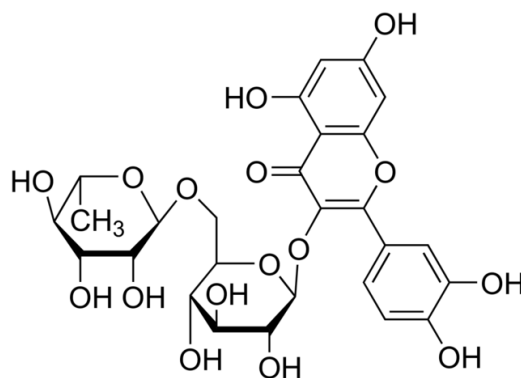
V nasledujúcej časti práce budú stručne predstavené látky, ktoré sú predmetom záujmu tejto štúdie.

Tab. 1. Podskupiny flavonoidov, ich chemické vlastnosti a významné zdroje [5, s. 307], [8, s. 3249]

Podskupiny flavonoidov	Poloha napojenia B kruhu na C kruh	Poloha dvojnej väzby na C kruhu	Funkčné skupiny na kruhu C	Výskyt v potravinách alebo nápojoch
flavanoly	2	žiadna	3-hydroxy 3-O-gallát	červené hrozno, olivy, cibuľa, kapusta, listový šalát, brusnice, cherry paradajky, zelený a čierny čaj, brokolica, pomarančový a grapefruitový džús, červené víno
flavanóny	2	žiadna	4-Oxo	grepfruity, pomaranče
flavóny	2	2-3	4-Oxo	zeler, olivy, petržlen
izoflavóny	3	2-3	4-Oxo	sója
flavonoly	2	2-3	3-hydroxy 4-Oxo	hrušky, jablká, červené a biele víno, zelený čaj
antokyanidíny	2	1-2, 3-4	3-hydroxy	červené, fialové a modré bobuľovité ovocie

1.1.1 Rutín

Rutín je flavonoid patriaci do podskupiny flavonolov. Z chemického hľadiska je to diglukozid polyfenolu quercetinu, pozri Obr. 2. Je to najčastejšie vyskytujúca sa glykozidická forma quercetinu. Rutín má cytoprotektívne, gastroprotektívne, hepatoprotektívne, protizápalové a anti-diabetické vlastnosti, ktoré boli preukázané v niekoľkých štúdiách. Jeho využitie je časté vzhľadom k tomu, že sa používa na liečenie zvýšenej lomivosti a priepustnosti krvných vlásočnic, ktoré sú súčasťou mnohých chorôb [11, s. 827], [12, s. 783].

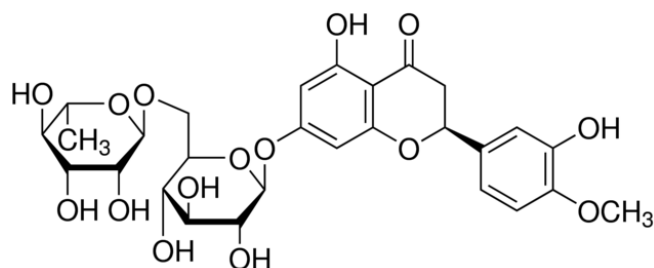


Obr. 2. Chemická štruktúra rutínu [13]

Rutín možno najčastejšie nájsť v mnohých typických rastlinách ako je pohánka, jablko, paradajky, broskyňa, pomaranč a čaj, ktoré chránia pred škodlivými účinkami ultrafialového žiarenia B (UV-B) a chorôb. Rutín sa javí ako žltý kryštalický prášok bez zápachu, ktorý je prakticky nerozpustný vo vode a zle rozpustný v alkohole [12, s. 784], [14, s. 73], [15, s. 6452].

1.1.2 Hesperidín

Hesperidín je glykozid, ktorý patrí do podskupiny flavonónov. Jeho aglykon sa nazýva hesperitín a je o ňom známe, že sprostredkováva účinky hesperidínu v tele. Chemická štruktúra je znázornená na Obr. 3, kde môžeme vidieť, že cukorná zložka hesperidínu je tvorená rutinózou (ramnóza naviazaná na glukózu). Hesperidín má rôzne farmakologické účinky, hlavne protizápalové, antioxidantné, antireumatické a vykazuje tiež anitimikrobiálne vlastnosti. Vďaka týmto účinkom je používaný ako podporná látka pri liečbe rakoviny prsníka, lymfedému, kardiovaskulárnych chorôb, hemoroidoch a kŕčových žíl. Farmakológia a farmakokinetika hesperidínu nie sú úplne objasnené [16, s. 241], [17, s. 78], [18].



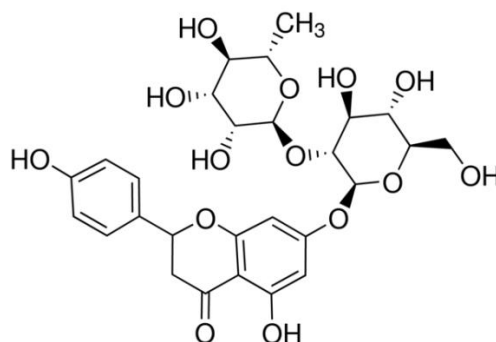
Obr. 3. Chemická štruktúra hesperidínu [19]

Hlavným zdrojom sú citrusové plody, hlavne pomaranče, kde je hlavným glykozidom. Vyskytuje sa predovšetkým v oplodí a šupke, konkrétne v albode (vnútorná belavá časť

oplodia citrónovníkov alebo pomarančovníkov). Hesperidín je prášok žltohnedej farby, ktorý po rozpustení v pyridíne dáva transparentný až mierne zakalený roztok [7, s. 199], [18], [19].

1.1.3 Naringín

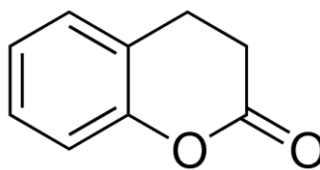
Naringín patrí medzi flavanónové glykozidy a vyskytuje sa predovšetkým v hrozne a greprfruitoch. V greprfruitoch až z 90% prevláda naringín. Jeho obsah v plodoch narastá a ustáli sa až v dobe zrelosti, pričom jeden plod obsahu je od 1 až do 6 g. Jeho chemickú štruktúru môžeme vidieť na Obr. 4. Naringín je intenzívne horká látka a teda zodpovedá za horkú chuť grapefruitov. V literatúre sa uvádza, že má protizápalové, antioxidačné, antirakovinové, antiaterogénne, hepatoprotektívne, a neuroprotektívne účinky. Bolo preukázané, že dokáže stlmiť expresiu alfa faktora nekrotizujúceho tumory (TNF- α) a transformujúci rastový faktor- β (TGF- β), o ktorom bolo zistené, že bol zapojený do patogenézy poranenia pľúc a pľúcnej fibrózy [7, s. 199–200], [20, s. 102].



Obr. 4. Chemická štruktúra naringínu [21]

1.1.4 Dihydrokumarín

Chroman-2-on označovaný aj ako dihydrokumarín či melitol a jeho deriváty majú široké spektrum vlastností. Klasifikuje sa ako polyfenol patriaci do podtriedy fenolpropanoidov, konkrétne medzi kumarínove deriváty. Z chemického hľadiska obsahuje dihydrokumarín pyranový kruh pripojený k benzénovému kruhu, ako vidieť na Obr. 5. V porovnaní s kumarínmi, dihydrokumaríny sa v prírode vyskytujú zriedkavo [2, s. 58], [22, s. 2].

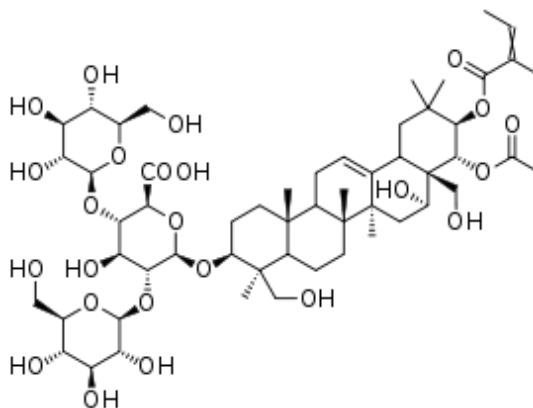


Obr. 5. Chemická štruktúra dihydrokumarínu [23]

Hlavným zdrojom dihydrokumarínu je *Melilotus officinalis*, čo je komonica lekárska. Ďalej sa našiel v semenách *Prunus mahaleb* (čerešňa mahalebková), v listoch jelenieho jazyka celolistého a v iných rastlinách. O prírodný dihydrokumarín je veľký záujem v odvetviach, kde je potreba ovplyvňovať chuť a vôňu výrobkov. Syntetický dihydrokumarín sa používa ako bežná vôňa v parfumoch, do kozmetiky, pleťových vôd, mydiel a ako príchuť v nápojoch a žuvacích gumách. V koncentráciách vyšších než 100 ppm sa nachádza v želatíne, pudingoch, mäkkých cukrovinkách, mrazených mliečnych výrobkoch a pečive. Dihydrokumarínu sú prisudzované protizápalové, imunologické a antioxidačné vlastnosti. [22, s.2–4], [24, s. 740].

1.1.5 Escín

Escín alebo aescín je hlavná účinná látka zo stromu pagaštan korský. Escínom je nazývaná prírodná zmes triterpénových saponínov. Escín existuje v dvoch formách, α a β , ktoré môžu byť rozlíšené podľa: bodu topenia, špecifickej rotácie, hemolytického indexu a rozpustnosti vo vode. Beta-aescín je aktívna zložka zmesi a je prítomná v hlavných dostupných farmaceutických prostriedkoch. Jeho chemickú štruktúru môžeme vidieť na Obr. 6. [25, s.183–184].



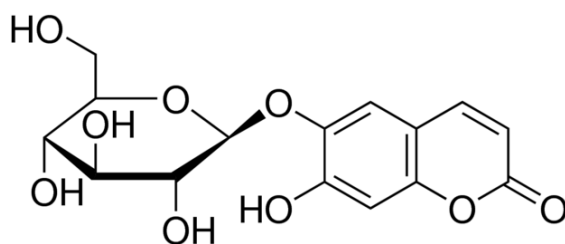
Obr. 6. Chemická štruktúra beta-escínu [26]

Terapeutický prínos escínu je dobre zdokumentovaný radmi experimentálnych výskumov, ktoré ukazujú na jeho jednoznačné protiopuchové, protizápalové a venoprotektívne

vlastnosti. To mu dáva významné klinické využitie pri chronickej žilovej nedostatočnosti (CVI), hemoroidoch a pooperačných opuchoch. Okrem toho má escín vynikajúcu znášanosť. Beta-aescín sa používa aj v kozmetickom priemysle pri prevencii a úprave celulitídy [25, s. 184], [26].

1.1.6 Eskulín

Eskulín ako dihydrokumarín patrí taktiež do podtriedy fenolpropanoidov, konkrétne medzi kumarínové glykozidy. Jeho chemická štruktúra je znázornená na Obr. 7, kde môžeme vidieť, že sa skladá z cukornej zložky glukózy a dihydroxykumarínu. Používajú sa aj iné názvy ako aeskulín, eskulín hydrát alebo eskulozid. V posledných rokoch sa dokázalo, že má antimutagénne, antioxidačné, protizápalové a protinádorové vlastnosti. Taktiež vykazuje anti-diabetickú aktivitu. Eskulín sa využíva ako taxonomický nástroj pri identifikácii širokého spektra mikroorganizmov a to vďaka tomu, že ho dokážu hydrolyzovať. Stanovujú sa tak rody *Streptococcus* a *Listeria*, anaeróbne mikroorganizmy a tiež čeľad *Enterobacteriaceae* [27], [28, s. 119], [29, s. 26], [30, s. 2069], [31, s. 472].



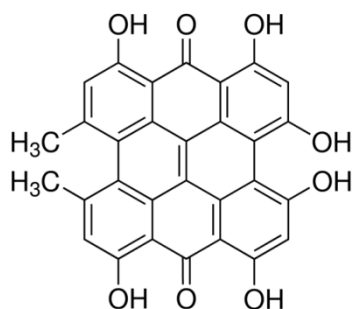
Obr. 7. Chemická štruktúra eskulínu [32]

Kvôli nevyhovujúcim fyzikálno-chemickým vlastnostiam ako je napr. obmedzená rozpustnosť vo vode, nízka hydrofobicita a zlá kompatibilita s biologickými membránami sa eskulín modifikuje. Používa sa esterifikácia cukornej zložky masnými kyselinami alebo fenolovými kyselinami. Eskulín je prirodzenou súčasťou mnohých liečivých rastlín, ale vyskytuje sa najmä v pagaštane konskom alebo v čakanke obyčajnej. Je prítomný v mladých stonkách, pričom koncentrácia eskulínu sa zvyšuje v období neskorej jari a najvyššia je v lete. Na jeseň sa opäť znižuje [33, s. 2249], [34, s. 766–768].

1.1.7 Hypericín

Hypericín sa bežne vyskytuje v ľubovníku bodkovanom, ale vyrába sa aj synteticky z antrachinónového derivátu emodínu. Jeho chemická štruktúra je znázornená na Obr. 8, kde možno vidieť, že sa skladá z iónového páru hypericínového monoaniontu, kationu pyridínu

a dvoch karbonylových skupín v polohách C7 a C14. Hypericín sa nerozpúšťa vo vode, oleji a väčšine iných nepolárnych rozpúšťadiel. Naopak – je rozpustný v alkalických vodných roztokoch, v organických zásadách ako je pyridín, a polárnych organických látkach, vrátane acetónu, ethanolu, metanolu, etylacetátu, methyl-ethyl ketónu. Hypericín dáva roztokom červené zafarbenie. Hypericín je tiež rozpustný v biologických médiách, čo je možné vďaka tvorbe komplexu hypericínu s biologickými makromolekulami. Táto vlastnosť sa používa vo fluorescenčných diagnostických nástrojoch *in vivo* a v klinických štúdiách [35, s. 233–234], [36, s. 206].



Obr. 8. Chemická štruktúra hypericínu [37]

Štúdie uvádzajú, že hypericín má antidepresívne, antineoplastické, protinádorové a antivírusové (vírus hepatitídy C a vírus ľudskej imunodeficiencie) účinky. Mechanizmy týchto aktivít sú stále do značnej miery nevysvetlené [35, s. 233].

2 HLAVNÉ ZDROJE ŠTUDOVANÝCH BIOAKTÍVNYCH LÁTOK A ICH FARMAKOLÓGICKÉ ÚČINKY

Flavonoidy sú veľká skupina polyfenolických zlúčenín, ktoré sa vyskytujú bežne v rastlinách a liečivých bylinách. Táto skupina obsahuje viac ako 8000 známych zlúčenín. Flavonoidy sú pigmenty zodpovedné za odtiene žltej, oranžovej a červenej farby v kvitnúcich rastlinách. Sú tiež dôležité pre rast, rozvoj a obranu rastlín. Väčšina flavonoidov sú biologicky aktívne a majú rôzne účinky, ako napr. protizápalový, antialergický, antischemický, imunomodulačný či protirakovinový. Bolo dokázané, že taktiež inhibujú aj niektoré enzýmy. V tejto kapitole sa budeme zaoberať bylinami ako sú pagaštan konský, pohánka tatárska, komunica lekárska, grep a ľubovník bodkovaný, ktoré sú zdrojom vybraných bioaktívnych látok a ich farmakologickými účinkami [38, s. 42–43]. Pozornosť bude venovaná predovšetkým bioaktívnym látkam, ktoré budú charakterizované v experimentálnej časti práce.

2.1 Pagaštan konský

Pagaštan konský, latinsky *Aesculus hippocastanum*, je veľký rýchlo rastúci strom, ktorý môže dosiahnuť výšku až 36 metrov. Ma guľovitú korunu a zelené listy, ktoré sú na okrajoch pilovité. Kôra je spočiatku hladká a s narastajúcim vekom hrubne a čiastočne sa odľupuje. Má ružové alebo biele kvety s malou červenou škvrnou a jeho semenom je gaštan, ktorý je skrytý v ostnitej tobulke. Pôvodom je z Gréckych hôr, Bulharska, Kaukazu, zo severného Iránu a Himalájí. Dnes je kultivovaný v medzinárodnom meradle, najmä v Európe a Rusku ako najbežnejší okrasný strom v rámci európskych miest, parkov a lesov. Gaštany boli používané v medicíne po celé stáročia. Indiáni používali ich opečené, olúpané a sťašovatené semená, pričom ich lúhovali vo vápne, aby boli menej toxické [39, s. 72], [40, s. 14626], [41].

Semeno pagaštanu, teda gaštan obsahuje 3-6% escínu, ďalej eskulín, flavonoidy, kondenzované taníny, chinín, steroly, mastné kyseliny (vrátane kyseliny linolenovej, kyseliny palmitovej a stearovej) a kumaríny (vrátane aesculetin, fraxinu a scopolínu). Za hlavnú účinnú látku sa považuje escín, ktorý pôsobí na kapilárnu membránu a normalizuje jej vaskulárnu permeabilitu [39, s. 74–75], [40, s. 14629].

2.1.1 Farmakologické účinky escínu

Escín existuje v dvoch formách α a β , ako už bolo poznamenané v kapitole 1.1.6, pričom beta forma je aktívna zložka, ktorá sa používa v liečivách. Sú mu prisúdené minimálne tri farmakodynamické mechanizmy a to protizápalová činnosť, činnosť proti opuchom a venoprotektívne vlastnosti. Vďaka týmto účinkom sa používa hlavne na liečenie CVI, čo je syndróm charakterizovaný porušením mechanizmu návratu žilovej krvi z dolných končatín do srdca. To spôsobuje opuchy nôh, bolesť, atrofické zmeny kože a vredy. V dostupných štúdiách, existujú presvedčivé dôkazy o tom, že extrakt z pagaštanu konského je účinný v liečbe miernej až stredne ťažkej CVI a jeho účinky môžu byť ekvivalentné ku kompresným pančuchám. Väčšina štúdií bola vykonaná s extraktom pagaštanu konského s obsahom približne 70% escínu. Existuje jasný dôkaz, že čím vyšší je percentuálny obsah aktívnej zložky, tým je vyššia terapeutická účinnosť [25, s. 184], [39, s. 73–74].

Bolo preukázané, že escín je účinný v prevencii tvorby edému na zápalových modeloch, ktoré reprodukovujú počiatočnú exudatívnu fázu. Je to napríklad edém labky vyvolaný sériou dráždivých látok (ovalbumín, dextrans, bavlnené pelety, karagén a bradykinín), seróznej peritonitídy vyvolanej u krýs injekciou formalínu a u myši karagénanom. Naopak, nie je účinný v prevencii edému na zápalových modeloch, ktoré reprodukovujú neskorú proliferatívnu fázu. To je napríklad edém vyvolaný formalínom v labke modelových krýs a granulóm modelových krýs. Okrem toho nie je účinný ani v experimentálnych modeloch polyartritídy. Escín dobre pôsobí proti zníženiu obsahu adenosíntrifosfátu (ATP) a zvýšeniu fosfolipázy A2 zodpovednej za uvoľnenie prekursorov zápalových mediátorov. Je tu okrem toho znížená neutrofilná adhéncia/aktivácia. To všetko vedie k ochrane žíl a zníženému opuchu [25, s. 184–185].

V štúdiu, kde sa pacientovi s CVI merala hustota leukocytov, neutrofilov a makrofágov v zápalovom výpotku bolo pozorované, že po podaní escínu (5 mg každých 12 h po dobu 7 dní) došlo ku 33 % zníženiu hustoty leukocytov na jednotku plochy. Makrofágy sa znížili približne o polovicu a boli nahradené neutrofilmi, ktoré sa zvýšili o 46%. Tieto zistenia naznačujú, že escín môže účinne zasahovať do bunkovej fázy zápalového procesu [25, s.185–186].

Venoprotektívne vlastnosti escínu boli potvrdené dosiahnutím žilovej kontraktúry v izolovaných ľudských povrchových žilách. Mechanizmus zvýšenia žilového tonusu je spojený so zvýšenou tvorbou prostaglandínu F₂ α v ľudských žilách. Kontraktúra bola ma-

ximálna pri koncentrácii 10^{-3} M, ale je celkom zrejma aj pri koncentráciách 10^{-6} až 10^{-7} M. Tieto koncentrácie môžu byť bezpečne dosiahnuté po perorálnom podaní [25, s. 186].

2.1.2 Farmakologické účinky eskulínu

Eskulín je kumarínový derivát, ktorý má viac biologických funkcií. Je to intestinálna protizápalová, antioxidačná, protinádorová a anti-diabetická aktivita. *Diabetes mellitus* je charakterizovaný hyperglykémiou a je hlavnou príčinou morbidity a mortality po celom svete. Abnormálne zvýšenie hladiny krvného cukru spôsobuje oxidačný stres a vznik konečných produktov pokročilej glykácie, ktoré sú úzko spojené s diabetickými komplikáciami. Diabetici majú zvýšené riziko pre niekoľko typov ochorenia obličiek, pričom prevládajúcou príčinou konečného štádia ochorenia obličiek u tejto poruchy je diabetická nefropatia. Lekárska terapia je pri tomto ochorení neuspokojivá a vyvoláva nežiaduce vedľajšie účinky. Podľa chemických a farmakologických výskumov sa zistilo, že existuje rad bioaktívnych a netoxických látok, ktoré by sa mohli použiť na liečbu diabetickej nefropatie. Štúdie *in vitro* ukázali, že práve eskulín a jeho metabolit eskuletín inhibuje tvorbu konečných produktov pokročilej glykácie. Tiež má potenciál pre zlepšenie citlivosti na inzulín a zmiernuje oxidačný stres. Ukazuje sa, že eskulín zlepšuje diabetes indukovaný dysfunkciou obličiek. Súčasné experimentálne výsledky poskytujú terapeutický dôkaz o renoprotektívnych účinkoch eskulínu a to ako *in vitro*, tak aj *in vivo* [30, s.2069–2070, 2073–2075].

Štúdia na antikarcinogénny účinok eskulínu bola robená s aflatoxínom B1. Aflatoxín B1 (AFB1) je mykotoxín produkovaný *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. Je to najtoxickejší aflatoxín a je považovaný za najsilnejší prirodzene sa vyskytujúci mutagén a karcinogén. AFB1 a jeho metabolity zvyšujú oxidačný stres buniek. Karcinogéza začína peroxidáciou lipidov, čo vedie k oxidačnému poškodeniu plazmatickej membrány. K týmto poškodeniam v bunke alebo tkanive dochádza, keď je koncentrácia reaktívnych foriem kyslíka (superoxidový radikál, hydroxylový radikál a peroxid vodíka) generovaný v množstve, ktoré presahuje antioxidačnú kapacitu bunky. Neenzymatické a enzymatické antioxidanaty tvoria hlavný mechanizmus obrany bunky. AFB1 vyvoláva zmeny najmä v pečeni a obličkách. Na základe štúdie sa dokázalo, že eskulín chráni obličkové bunky proti nefrotoxite vyvolanej AFB1 vychytávaním voľných radikálov a stimuláciou enzymatických aj neenzymatických antioxidantov buniek. Vďaka antioxidačným vlastnostiam eskulínu bola úroveň peroxydácie lipidov znížená [29, s. 25–26, 30–31].

2.2 Pohánka tatárska

Pohánka tatárska, latinsky *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn, patrí medzi pseudocereálie. Neobsahuje lepok a preto je odporúčaná pre celiatikov. Pestuje a používa sa v horských oblastiach juhozápadnej Číny (Sichuan), v severnej Indii, Bhutáne a Nepále. V Európe sa v súčasnej dobe pohánka tatárska pestuje ako plodina len v Luxembursku. Je to jednoročná rastlina, ktorá dosahuje výšku 40 až 70 cm, vo výnimočných prípadoch až 140 cm. Listy sú dlhšie a úzke a okvetie má nádych zelenkavej farby. Plodom je trojboká nažka, ktorá je od bežnej pohánky asi štyrikrát dlhšia. Zrno pohánky obsahuje bielkoviny s vysokou biologickou hodnotou a vyváženým zložením aminokyselín, relatívne vysoké množstvo hrubej vlákniny, vitamíny B1, B2, B6 a bioaktívne komponenty ako sú fytosteroly, skvalén, fagopyritoly a polyfenoly. Polyfenoly majú dôležitú úlohu pri ochrane rastlín pred ultrafialovým žiarením, patogénmi a bylinožravcami. Majú antioxidačné vlastnosti, ktoré môžu inhibovať peroxidáciu lipidov, ďalej znižujú kapilárnu krehkosť spojenú s hemoragickými zmenami, znižujú vysoký krvný tlak a riziko arteriosklerózy [15, s. 6452], [42, s. 4883] [43].

V metanolovom extrakte pohánky boli nájdené glykozidy flavanolov vrátane rutínu, kvercetínu a kaemferol-3-rutinozidu, ako aj stopové množstvá flavanolov triglykozidov. Pohánka tartárska je hlavným zdrojom rutínu a obsahuje vyššie koncentrácie rutínu v porovnaní s bežnou pohánkou, inými obilninami a oproti väčšine ovocia a zeleniny. Zrná bežnej pohánky obsahujú asi 10 až 30 mg rutínu na 100 g suchej hmotnosti, zatiaľ čo zrno pohánky tatárskej obsahuje asi 1-2 g rutínu na 100 g suchej hmotnosti [15, s. 6452], [42, s. 4883], [44, s. 99].

2.2.1 Farmakologické účinky rutínu

Živé organizmy nie sú schopné syntetizovať rutín. Rutín sa do tela dostáva pomocou prijímania rastlinných produktov ako je ovocie, zelenina, čajové lístky, kávové zrná, atď. Niekoľko liekov obsahujúcich rutín alebo jeho chemicky modifikované analógy je v súčasnej dobe k dispozícii na farmaceutickom trhu. Napríklad prípravok "Askorutin" je ponúkaný vo forme tabliet s obsahom rutínu (0,05 g) a kyseliny askorbovej (0,05 g). Je indikovaný pre prevenciu a komplexnú liečbu chorôb spojených so zvýšenou priepustnosťou ciev. Prípravok "Troxerutín" obsahuje chemicky modifikovaný rutín a vyrába sa vo forme gélu a tabliet. Používa sa na kŕčové žily, CVI a modriny. Rutín sa tiež pridáva do rôznych multivitamínových prípravkov (napr. Arovit, vitamíny z Vitrum, Complivit, Undevit) a

preparátov, ako je Wobenzym, Influnet, Antigrippin, atď. Rutín sa relatívne zle absorbuje v črevách. Mikroflóra dolného čreva gastrointestinálneho traktu hydrolyzuje rutín, jeho aglykón quercetin a zvyšok cukru, ktoré sú následne absorbované stenou tenkého čreva. Pri perorálnom podaní rutínu potkanom v jednorazovej dávke 2,3 mg/kg sa absorbovalo približne 20% z podanej dávky. Rutín sa vylučuje žľou a močom ako glukuronidy a sulfáty do 48 hodín [14, s. 73–74].

Rutín je považovaný za veľmi dobrý antioxidant, pretože je schopný viazať voľné radikály a chelatovať kovové ióny, ktoré môžu iniciovať tvorbu voľných radikálov kyslíku. Vlastnosť rutínu viazať voľné radikály hrá dôležitú úlohu pri ochrane DNA pred rôznymi druhmi oxidačných poškodení. Rutín inhibuje peroxidáciu lipidov, čo je jeden z hlavných faktorov pri vývoji rôznych kardiovaskulárnych a neurodegeneratívnych ochorení. Na základe toho môže byť rutín účinný pri liečení aterosklerózy. Rutín tiež inhibuje xantínoxidázu, ktorá sa zúčastňuje v reakciách, ktoré vedú k oxidačnému poškodeniu (ischemicko-perfúzny syndróm). Aglykón rutínu je tiež schopný znižovať riziko vzniku a rozvoja ischemického a reperfúzneho poškodenia znížením aktivity indukovanej syntázy oxidu dusnatého (NOS). Bolo tiež preukázané, že aglykón rutínu môže inhibovať agregáciu krvných doštičiek, čím sa znižuje riziko tvorby trombu.

Rutín môže byť tiež použitý ako protizápalová látka, pretože vychytávaním voľných radikálov zabraňuje indukciu zápalových cytokínov. To je dôvodom jeho účinnosti pri liečení chronických zápalových ochorení. Je tiež antagonistom proteínu kalmodulínu, ktorý sprostredkovoáva prenos Ca^{2+} iónov cez bunkové membrány a iniciuje intracelulárne procesy. To vyvoláva inhibíciu kalmodulín-dependentných bunkových enzýmov (ATP-ázy a fosfolipázy) a zároveň ovplyvňuje priepustnosť bunkových membrán. Rutín teda môže inhibovať fosfolipázy, ktoré katalyzujú premenu kyseliny arachidonovej. Kyselina arachidonová je pritom hlavný substrát pre výrobu látok, ako sú tromboxány a mediátory zápalu (prostaglandíny, leukotriény).

Tumor necrosis factor alpha, tumor nekrotizujúci faktor alfa (TNF- α), je jedným z hlavných cytokínov a podieľa sa na patogenéze chronických zápalových ochorení. Aglykón rutínu inhibuje vo významnom rozsahu tvorbu TNF- α . Zníženie TNF- α v prítomnosti rutínu demonštruje vplyv flavonoidov na schopnosť regulovať imunitnú odpoveď [14, s. 74].

2.3 Komonica lekárska

Komonica lekárska, latinsky *Melilotus officinalis* (L.), je rastlina vyskytujúca sa v Európe a Ázii. Je to dvojročná aromatická rastlina, 30 až 170 cm vysoká. Býva bohato vetvená a má trojčlenné lístky s riedko zubatým až hladkým okrajom. Kvetenstvo vyrastá v úžľabine listov a nesie 20-60 kvetov. Kvety sú žltej farby a majú zvončekový päťcípový tvar. Kvety majú charakteristickú sladkú vôňu, ktorá je odvodená od obsahu kumarínu. Jej hlavné farmakologické vlastnosti sú hypokoagulačné, anti-agregačné, antioxidačné a hepatoprotektívne. Tiež chráni a obnovuje vnútorné steny krvných a lymfatických ciev a zabraňuje tvorbe trombov a embólie. Bolo experimentálne dokázané, že komonica regeneruje pečeneňový parenchým a vďaka všetkým jej účinkom sa používa ako liečivá bylina. Jej biologicky aktívne látky boli detailne študované. Obsahuje 0,4-0,9% kumarínu, kyseliny kumarínovej, dikumarol, dihydrokumarín, silice a polysacharidy. [45, s. 585], [46, s. 82].

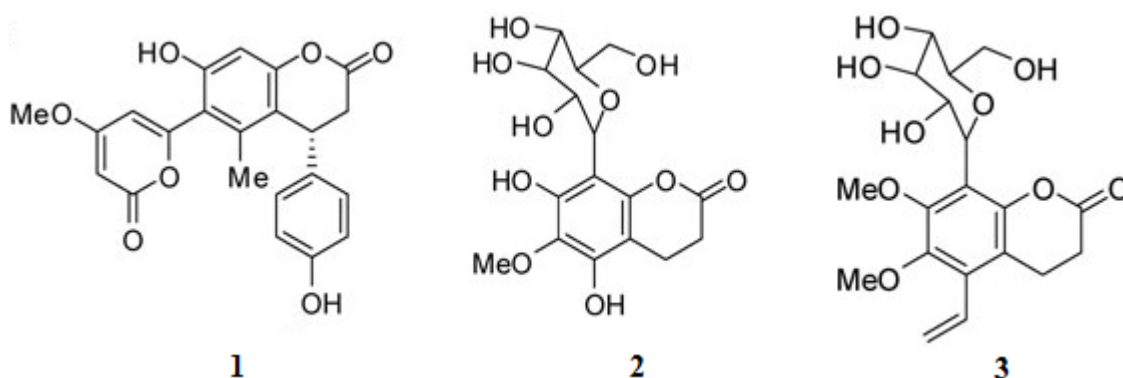
2.3.1 Farmakologické účinky dihydrokumarínu

Dihydrokumarín patrí medzi kumaríny a jeho deriváty, ktoré majú široké spektrum vlastností. Dihydrokumarín má schopnosť inhibovať niekoľko ľudských sirtuínov produkovaných génmi SIRT1 a SIRT2. Sirtuíny sú proteíny, ktoré regulujú dôležité biologické dráhy u baktérií, archaea a eukaryotických buniek. Štúdie naznačujú, že ľudské sirtuíny môžu fungovať ako vnútrobunkové regulačné proteíny s mono-ADP-ribozyl-transferázovou aktivitou. Sú zapojené do ovplyvňovania širokej škály bunkových procesov ako je starnutie, transkripcia, apoptóza, zápaly a odolnosť voči stresu, ako aj energetická účinnosť a bdelosť počas nízkokalorických situácií. Proteín sirtuín 1 sa spája s niekoľkými chorobami, ktoré súvisia s vekom, vrátane diabetes, kardiovaskulárnych chorôb, neurodegeneratívnych chorôb a rakoviny. Je to z dôvodu, že sirtuín 1 podporuje prežívanie buniek, a tak chráni bunky s poškodenou DNA pred opravou cez apoptózu [22, s. 2, 4], [47, s. 27], [48], [49].

Dihydrokumarín tiež zvyšuje koncentráciu acetylovaného proteínu p53, ktorý v bunkových kultúrach zvyšuje hladinu apoptózy. Proteín p53 je veľmi dôležitý v mnohobunkových organizmoch, kde zabraňuje tvorbe rakoviny, teda funguje ako nádorový supresor. Aktivuje sa po poškodení buniek a vyvoláva množstvo bunkových odpovedí, ako je reparácia a prežívanie buniek, alebo programovaná smrť bunky [22, s. 4], [50, s. 57].

Zistilo sa, že substituované dihydrokumaríny majú vďaka svojej základnej štruktúre predispozíciu správať sa ako výborné antioxidanty. Niektoré substituované dihydrokumaríny

sú zobrazené na Obr. 9. Dihydrokumarín nachádzajúci sa v *Aloe vera* (1) pôsobí ako antioxidant, a ráta sa s jeho využitím ako imunomodulačného liečiva na imunitný systém. Môže vyvážiť úroveň fyziologickej hladiny reaktívnych kyslíkových druhov, ktoré môžu byť užitočné pre udržanie homeostázy. Substiované dihydrokumaríny (2,3) vykazujú relatívne vysokú cytotoxickú aktivitu proti trom ľudským karcinogénnym bunkovým líniam, a to pečene (HepG2), krčka maternice (HELA) a hrubého čreva (HCT116) [22, s. 4].



Obr. 9. Niektoré zo substituovaných dihydrokumarínov [22, s. 5]

2.4 Ľubovník bodkovaný

Ľubovník bodkovaný, latinsky *Hypericum perforatum* alebo tiež svätójánska bylina. Pochádza z Európy, západnej Ázie a severnej Afriky a neskôr bol rozšírený do Severnej a Južnej Ameriky a Austrálie. Je to väčšinou nevetvená 100 cm vysoká rastlina. Listy má vajcovitého alebo podlhovastého tvaru. Ľubovník je bohatý na kvety, ktoré sú žltej farby. Plodom je tobolka. Už Gréci a Rimania zdokumentovali jeho použitie v liečbe nervových porúch. Výťažky z ľubovníka bodkovaného obsahujú viac ako 25 bioaktívnych látok. Za hlavné účinné komponenty ľubovníka bodkovaného sú považované hypericín, pseudohypericín a hyperforin. Obsahuje aj iné rastlinné zložky (napr. flavonoidy a ich deriváty, deriváty xantínu, amentoflavón, biapigenin, éterické oleje), ktoré môžu mať antidepresívne účinky. Aby sa pochopili účinky týchto zložiek samostatne alebo v kombinácií, je potrebný ďalší výskum [51, s. 2249], [52, s. 128] [53].

Uvádza sa, že ľubovník má protizápalové, upokojujúce, analgetické a hojivé vlastnosti. Tiež sa používa ako diuretikum. Navyše laboratórne testy ukazujú, že ľubovník bodkovaný má antivírusovú aktivitu. Najprv sa predpokladalo, že hypericín je zodpovedný za antidepresívny účinok ľubovníka bodkovaného, avšak nedávne experimentálne a klinické výsku-

my ukázali, že hyperforin je hlavná zlučenina, ktorá sa podieľa na antidepresívnej aktivite. Medzitým sa zistilo, že pseudohypericín a hypericín inhibujú niekoľko zapuzdrených vírusov *in vitro*, vrátane vírusu *herpes simplex* a vírusu nedostatku ľudskej imunity 1 (HIV-1) [52, s. 128].

2.4.1 Farmakologické účinky hypericínu

Medzi základné farmakologické účinky hypericínu sa zaraďujú účinky protinádorové a antivírusové. Mechanizmy týchto účinkov sú stále v stave skúmania. Pri orálnom podávaní sa hypericín resorbuje v čreve, bez toho aby bol metabolizovaný. Na základe chemickej štruktúry sa predpokladá, že sa bude vylučovať do žlče. V moči nebol detegovaný [35, s. 233, 240].

Vírusové ochorenia a rakovina sú jedným z najväznejších zdravotných a sociálnych problémov ľudstva. Hoci virucidná a antivírusová aktivita hypericínu a spôsob pôsobenia boli široko študované, výsledky jeho *in vivo* a *in vitro* aktivity zostali sporné. Rovnako tak sú stále nejasné fyzikálno-chemické mechanizmy biologickej aktivity hypericínu na bunkovej úrovni. Je ale známe, že hypericín deaktivuje celú radu lipidov, ktoré tvoria obal vírusov [35, s. 241].

Početné výskumy ďalej ukázali, že hypericín je toxický pre bunky zdravých tkanív cicavcov a pre nádorové bunky po ožiarení viditeľným alebo ultrafialovým svetlom. Avšak štúdie o antiproliferatívnych, antineoplastických, protinádorových a tumoricidných účinkoch, ktoré sa skúmali na bunkových kultúrach *in vitro* sa vzťahujú len k hypericínu vo fotoaktivovanom stave. Žiadne cytotoxické účinky neboli pozorované, keď boli bunky chránené pred svetlom, alebo ožarované v neprítomnosti hypericínu. Iná štúdia uvádza, že cytocidný účinok hypericínu na svetle je závislý na koncentrácií a má cytostatické vlastnosti na niekoľkých typov buniek aj v tme [35, s. 246].

Bolo tiež zistené, že hypericín sa hromadí na povrchu malých nádorov, ktoré potom môžu byť detegované pomocou fluorescenčných diagnostických nástrojov. Pri nízkych koncentráciách hypericínu vzhľadom k jeho vysokej citlivosti a špecifickosti je v dutých ľudských orgánoch, ako je močový mechúr a žalúdok, selektívnym nádorovým činidlom. Vyššie koncentrácie hypericínu sú podávané do dutých orgánov pri fotodynamickej terapii týchto nádorov [35, s. 247].

2.5 Grep

Grep je plod citrónovníka rajského (*Citrus paradisi*), ktorý vznikol krížením jamajského pomarančovníka (*Citrus sinensis*) a indonézskeho pomela (*Citrus maxima*). Je to celoročne zelený strom, ktorý rastie do výšky až 8 metrov. Listy sú tmavo zelené a nikdy neopadávajú. Kvety majú 5 okvetných lístkov a sú veľké asi 5 cm. Plodom je grapefruit, ktorý má v priemere 10 až 15 cm. Dužina je delená na oddiely, jej farba je premenlivá – od bielej, ružovej až do červenej. Grapefruitový strom ročne rodí až 700 kusov grepu. Pestuje sa v Brazílii, Texase, Kalifornii, na Floride alebo aj v Turecku a Španielsku. Chuť je zmesou sladkosti a štiplavosti pomaranča a kyslosti citrusových plodov. Je bohatým zdrojom vitamínu C a draslíka [47], [54, s. 31].

Grepfruitový extrakt sa skladá z flavonoidov naringínu, naringenínu, quercetínu, kaempferolu, hesperidínu a furanokumarínu ako bergamotín a jeho deriváty. Koncentrácia flavonoidov a furanokumarínov v extrakte vykazuje značnú variabilitu v závislosti od pôvodu, zrelosti, akosti surovín a podmienok skladovania. Prítomnosť flavonoidov je rozdielna aj v samotnom plode podľa toho, či sa jedná o flavedo, albedo, dužinu alebo semeno. Flavedo je vonkajšia vrstva plodu a volá sa tak podľa svojej charakteristickej žltej farby. Vnútorňa mäkká vrstva je biela a nazýva sa albedo. Pri porovnávaní koncentrácie a rozdelení naringínu, naringenínu, bergamotínu a 6, 7-dihydroxybergamotínu medzi čerstvými odrodami bieleho a červeného grapefruitu sa zistilo, že extrakty z bieleho grapefruitu vykazovali vyššie koncentrácie naringínu, bergamotínua 6, 7-dihydroxybergamotínu, ktoré sa nachádzajú v albede a flavede. Najnižšie koncentrácie boli nájdené v semenách a v dužine červeného grapefruitu. Všeobecne biele grapefruity vykazujú vyšší obsah naringínu, bergamotínu, a 6, 7-dihydroxybergamotínu v porovnaní s ružovými alebo červenými odrodami [55, s. 250, 253].

2.5.1 Farmakologické účinky naringínu

Naringín má viac farmakologických účinkov vrátane antioxidačného, protizápalového a taktiež vyrovnáva vysokú hladinu cholesterolu. Okrem toho má naringín tiež antidiabetické, antiapoptotické a kardioprotektívne vlastnosti. Chráni srdcové bunky H9c2 pred zraneniami indukovaných vysokým obsahom glukózy a to blokáciou mitogeneticky aktivovaného proteínu kinázy [56, s. 293].

Diabetes mellitus je choroba, ktorej znakmi sú aj nehojace sa vrede, ktoré môžu viesť až k syndrómu diabetickej nohy. Liečenie syndrómu je veľmi zložitá a neexistuje naň univerzálny liek. Súčasné lieky sú nedostačujúce, preto je potreba nových terapeutických látok s minimálnymi vedľajšími účinkami. Všeobecne platí, že tento syndróm významne ovplyvňuje kvalitu života pacientov [20, s. 101–102].

Účinnosť naringínu na hojenie vredov sa študovala na krysách, ktorým sa chirurgicky poranila ich zadná labka. *Diabetes mellitus* bol indukovaný streptozotocínom. Liečba naringínom významne zmenšila oblasť rany a významne zvýšila rýchlosť jej kontrakcie. Tiež zvýšila úroveň prirodzeného antioxidantu superoxid dismutázy a glutatiónu a hladinu myeloperoxidázy, ktorá pomáha neutrofilom k likvidácii baktérií a iných patogénov. Naringín tiež znižuje hladinu glukózy v krvi, zlepšuje antioxidantný status, expresiu niektorých zápalových mediátorov ako TNF- α a expresiu rastových faktorov, čo vedie k menším oneskoreniam v hojení chronických diabetickejch vredov [20, s. 103–106, 111].

Naringín spolu s hesperidínom a jeho vo vode rozpustným derivátom G-hesperidínom sa ukázal byť účinný pri liečbe krvného tlaku a mozgovej trombózy. Predpokladá sa, že oxid dusnatý (NO) prispieva k prevencii patogeneze kardiovaskulárnych ochorení. Reaktívne formy kyslíka znižujú biologickú dostupnosť NO a oxidačný stres spôsobuje endoteliálnu dysfunkciu, progresívne aterogenézy a trombózy. Silné antioxidantné vlastnosti hesperidínu, G-hesperidínu a naringínu môžu modulovať inaktiváciu NO a chrániť funkciu endotelu pred reaktívnymi formami kyslíka. Endoteliálna funkcia bola výrazne zlepšená podávaním týchto doplnkov. Zvýšením biologickej dostupnosti NO môžu tieto látky prispieť svojim priaznivým vplyvom na mechanizmy hypertenzie a trombózy [57, s. 1272, 1276].

2.5.2 Farmakologické účinky hesperidínu

Hesperidín je diglukozid a z toho dôvodu sa nevstrebáva v tenkom čreve ako monoglukozidové flavonoidy. Absorbujú sa cez hrubé črevo, kde ho pred absorpciou črevná mikroflóra fermentuje na voľný hesperitín. Ten potom prechádza cez črevnú stenu do krvného obehu. Hesperitín je aglykón hesperidínu. Pri fermentácii môžu vzniknúť aj iné látky ako napr. kyselina p-hydroxyfenylpropiónová, kyselina p-kumarová, kyselina p-hydroxybenzoová a kyselina fenylpropionová. Po absorpcii hesperitín ľahko glukuroniduje, väčšinou na hesperitín-7-O-glukuronid. Terapeuticky užitočné vlastnosti hesperidínu sú antioxidantné, neuroprotektívne a vykazujú aj protinádorovú aktivitu. Jeho aglykón hesperitín má najmä antioxidantné a antivírusové účinky [18], [58, s. 103].

Pri vyšetrení kvasiniek pre dlhovekosť bolo zistené, že hesperidín bol schopný zvýšiť aktivitu Sir2 génu (ľudský homolog je SIRT1) a superoxidu dismutázy, čo vedie k nižšej tvorbe reaktívneho kyslíka. Bolo tiež zistené, že zvyšuje životaschopnosť neurálnych hrebeňových buniek [18].

Hesperidín má aj antidepresívny účinok – bolo zistené, že blokuje 5-HT 1A receptor. Môže byť preto predmetom záujmu pre liečenie depresívnych porúch. Na patogenéze depresie sa podieľa primárne alebo sekundárne aj oxidačný stres. Zvýšenie oxidačného stresu svedčí o strate antioxidantnej obrany, čo je spojené so zvýšenou citlivosťou na peroxidáciu lipidov. Predklinické štúdie naznačujú, že antioxidanty (zachytávače radikálov), ako napríklad hesperidín alebo hesperitín môžu mať aj touto cestou antidepresívny účinok [58, s. 103].

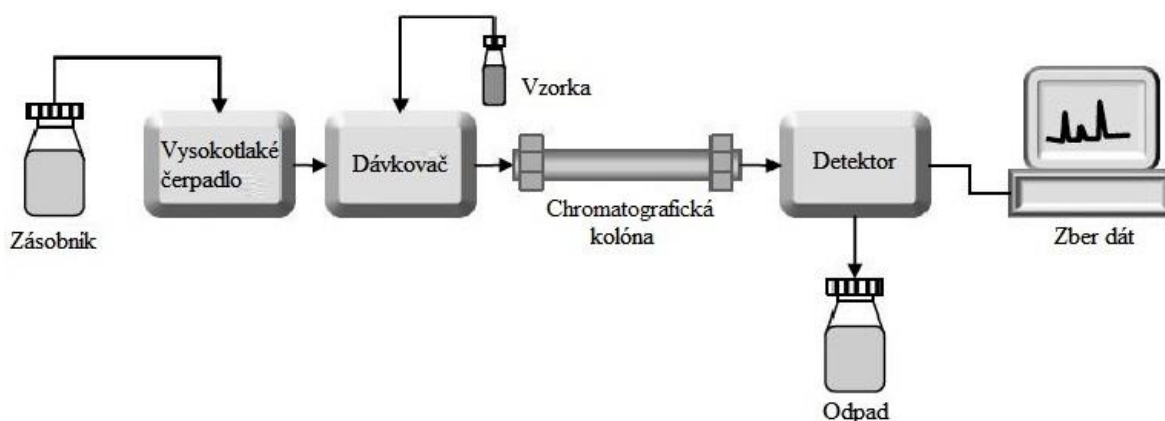
Častým dôvodom neschválenia liečiv je ich hepatotoxicita. Napríklad cytostatikum cyklofosamid (CYP) indukuje hepatotoxicitu, o čom svedčí výrazné zvýšenie hladiny zápalových cytokínov, sérových transamináz, oxidu dusnatého a peroxidácia lipidov v pečeni. Hesperidín vykazuje silný ochranný účinok pečene pred CYP a ním vyvolanému oxidačnému stresu a zápalu, ktorý vedie k hepatotoxicite. Je dokázané, že hesperidín uplatňuje svoj ochranný účinok proti CYP-indukovanej hepatotoxicite prostredníctvom regulácie PPAR (receptor aktivovaný proliferátorom peroxizómov) a odstránením zápalu a oxidačného stresu. CYP sa inak bežne používa pre liečbu rôznych druhov rakoviny a ako imunosupresívne činidlo pre orgánové transplantácie [59, s. 717–718].

3 VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, high-performance liquid chromatography (HPLC) je separačná metóda. Je to veľmi obľúbená a používaná metóda pre kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu vzorky. Princípom HPLC je, že vzorka sa preniesie medzi dve nemiešateľné fázy, mobilnú (pohyblivú) a stacionárnu (nepohyblivú). Podľa afinity jednotlivých zložiek je potom vzorka rozdelená medzi tieto fázy. V prípade HPLC je mobilná fáza kvapalina a stacionárna fáza je tuhá látka alebo kvapalina, ktorá je prichytená na tuhom nosiči. HPLC sa potom môže klasifikovať podľa použitej stacionárnej fázy na normálnu a reverznú (RP-HPLC). Pri RP-HPLC má stacionárna fáza nepolárny charakter a väčšinou to bývajú zlúčeniny s dlhými uhlikatými reťazcami naviazané na nosičoch. Mobilná fáza je naopak polárna, bývajú to väčšinou vodné roztoky kyselín či zásad, alebo pufer, poprípade ich zmesi s polárnymi organickými rozpúšťadlami. Chromatografia na normálnej fáze má potom mobilnú fázu nepolárnu a stacionárnu fázu polárnu. Existujú aj ďalšie mechanizmy chromatografickej separácie a to napr. na základe adsorpcie, rôznej rozpustnosti, podľa iónovej výmeny či špecifických interakcií [60, s. 10, 25], [61, s. 11, 101, 134].

3.1 Inštrumentácia HPLC

HPLC sa všeobecne skladá zo: zásobníkov mobilnej fázy, odplyňovača, vysokotlakého čerpadla, dávkovača vzorku (autosampler alebo manuálny dávkovací ventil), chromatografickej kolóny, detektora a zariadenia ktoré vykonáva zber dát pomocou počítača so softwérom, ako môžeme vidieť na Obr. 10.



Obr. 10. Schéma vysokoučinnnej kvapalinovej chromatografie [62]

Táto skladba sa môže potom individuálne líšiť. Priebeh analýzy spočíva v čerpaní mobilnej fázy zo zásobníku cez odplyňovač do vysokotlakového čerpadla. Mobilnú fázu môže tvoriť

jeden roztok, ktorého zloženie sa počas analýzy nemení (izokratická elúcia), alebo viac roztokov (gradientová elúcia). Pri gradientovej elúcií je potom ešte pred čerpadlom zariadený zmiešavač, kde dochádza ku zmiešaní roztokov. Mobilná fáza ďalej putuje cez dávkovač vzorku do kolóny, ktorá je napojená na detektor. Detektor potom posiela informácie do počítača, kde sa vyhodnocujú. Vzorka z detektoru ide do zberu jednotlivých frakcií [61, s. 32–33].

Detektor je komponenta, ktorá premieňa fyzikálny alebo chemický atribút do merateľného signálu, ktorý zodpovedá koncentrácii alebo identite. Najpoužívanějšími detektormi sú refraktometrický (RI), spektrofotometrický (UV-VIS, DAD), detektor evaporatívneho rozptylu svetla (ELSD), fluorescenčný detektor (FL) a hmotnostný detektor (MS). [63, s. 1131–1132].

3.2 Základné chromatografické charakteristiky

Medzi základné charakteristiky HPLC patrí: retenčný čas alebo objem (t_R/V_R), výška (h) a šírka píku (w), počet teoretických poschodí (N), asymetria píkov (A_s), rozlíšenie píkov (R_s), retenčný faktor (k) a iné.

3.2.1 Retenčný čas a objem

Každá separovaná látka má svoju základnú charakteristickú veličinu a tou je retenčný čas. Je to čas, ktorý je potrebný k dosiahnutiu maxima elučnej krivky (vrchol píku) od nástreku vzorky. Retenčný čas je kvalitatívnou charakteristikou látky. Retenčný objem je oproti tomu celkový objem mobilnej fázy, ktorý pretečie za tento čas kolónou. Medzi retenčným časom t_R a retenčným objemom V_R existuje vzťah:

$$V_R = F_m \times t_R \quad (1)$$

kde F_m je objemový prietok mobilnej fázy a väčšinou je udávaný v ml/min. Existuje ešte tzv. mŕtvý čas a objem kolóny. Ten je definovaný ako čas (objem) látky, ktorá nie je na kolóne zadržovaná, a teda sa pohybuje rovnakou rýchlosťou ako mobilná fáza. Táto látka je teda inertná k stacionárnej fáze [61, s. 12].

3.2.2 Počet teoretických poschodí

Účinnosť chromatografickej separácie pri izokratickej elúcií sa určuje počtom teoretických poschodí. Vyjadruje teda kvalitu separácie. Čím vyšší je počet teoretických poschodí, tým je tato kolóna účinnejšia. Zjednodušene sa počíta pomocou rovnice:

$$N = konst \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \quad (2)$$

kde w je šířka píku v jeho příslušnej výške. Existuje viac rovníc pre výpočet, najčastejšie sa potom používa výpočet s polovičnou šírkou píku w_{50} . Počet teoretických poschodí nie je konštatná veličina pre konkrétnu kolónu, ale závisí aj od retenčného faktora (vid'. 3.2.3) a od stavu stacionárnej fázy. Pri gradientovej elúcii je potom mierou účinnosti veličina nazvaná kapacita separácie (n_p). Vyjadruje počet píkov, ktoré v určitom časovom úseku môžu mať na základnej línii rozlíšenie 1,5 [61, s. 14–16, 30].

3.2.3 Retenčný faktor

Retenčný faktor k je mierou retencie delených látok. Počíta sa pomocou mŕtveho času (t_M) alebo mŕtveho objemu (V_M) kolóny (Rov.3):

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{V_R - V_M}{V_M} \quad (3)$$

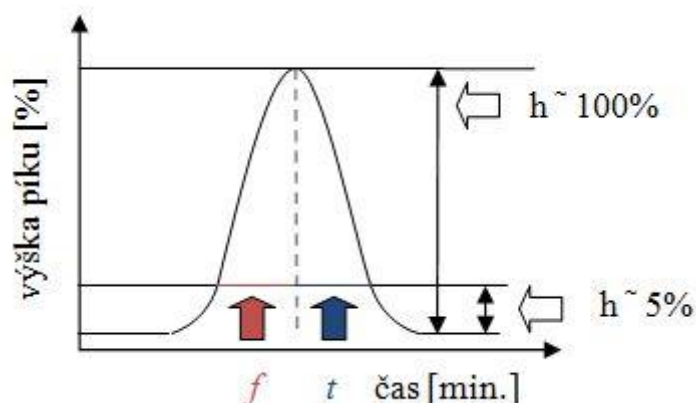
Z uvedenej rovnice vyplýva, že všetky látky strávia v mobilnej fáze rovnaký čas a rozdiel teda vzniká na stacionárnej fáze. Táto veličina sa používa na ako charakteristika pri izokratckej chromatografii. Pri gradiente je zavedený retenčný faktor k_e , ktorý je priemernou hodnotou k behom gradientovej elúcie. Ten sa potom počíta podľa Rov. 4:

$$k_e = \frac{1}{2,3 \times b_g} \quad (4)$$

kde b_g je strmnosť gradientu [61, s. 13, 29].

3.2.4 Asymetria a rozlíšenie píkov

Ďalším vyjadrením kvality separácie je asymetria píkov. Tá sa vyjadruje dvoma spôsobmi, a to buď faktorom chvostovania (T_f) alebo faktorom asymetrie. Faktor chvostovania je definovaný ako šířka píku v 5 % výšky ku dvojnásobku šířky píku vzostupnej časti (f). Faktor asymetrie zase ako pomer šířky zostupnej časti píku (t) k vzostupnej časti píku (f) v 5 alebo 10 % výšky píku. Grafické znázornenie možno vidieť na Obr. 11



Obr. 11. Grafické znázornenie výpočtu asymetrie píku [61, s. 17]

V ideálnom prípade je asymetria píku rovná jednej. Keď dôjde ku chvostovaniu je faktor vyšší ako jedna. Ak je nižší potom dochádza ku frontovaniu píku [61, s. 17–18].

Rozlíšenie je parameter, ktorý hovorí ako kvalitne sa separujú zložky vzorky. Udáva, či je táto separácia dokonalá, a teda rozlíšenie dvoch susediacich píkov je rovné alebo väčšie ako 1,5. Pri nedokonalom rozlíšení je táto hodnota menšia a dochádza k prekrývaniu píkov. Výpočet rozlíšenia sa líši u izokratickej a gradientovej elúcie [61, s. 25–26].

3.3 Validácia metód HPLC

V súčasnosti je požadované, aby nové analytické metódy boli v rámci kontroly kvality validované. Výsledky analytických meraní majú totiž silný dopad v praxi. Pojem validácia znamená overenie alebo kontrola, a teda je to preukázanie toho, že použitá metóda je vhodná pre zamýšľané použitie a jej použitím sa získajú relevantné dáta. Je to proces určenia charakteristík, vrátane obmedzení metódy a identifikácie vplyvov, ktoré môžu meniť tieto charakteristiky. Pre správne vykonanú validáciu je kritický výber validačných parametrov. Medzi validačné parametre podľa ICH (*The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) patrí: správnosť, presnosť, opakovateľnosť, reprodukovateľnosť, selektivita a špecifita, limit detekcie, limit stanoviteľnosti, lineárnosť, rozsah a robustnosť [64, s. 141–142], [65, s. 2], [66, s. 7, 10].

3.3.1 Správnosť

Správnosť je definovaná ako tesnosť zhody medzi výsledkom merania a určenou referenčnou hodnotou. Rozdiel medzi touto referenčnou hodnotou a nameraným výsledkom sa nazý-

va chyba výsledku a rozdiel medzi priemerom nameraných výsledkov a referenčnou hodnotou zase odchýlka. Pomocou štatistiky sa potom testuje štatistická významnosť veľkosti rozdielu medzi výsledkami meraní a prijatou referenčnou hodnotou. Týmto testom sa zisťuje prítomnosť alebo neprítomnosť sústavnej chyby [64, s. 143–144].

3.3.2 Presnosť, opakovateľnosť a reprodukovateľnosť

Presnosť je hodnota, ktorá udáva mieru tesnosti zhody medzi nezávislými výsledkami skúšok za predom špecifikovaných podmienok. Nezávislé výsledky sú také, ktoré sú získané bez ovplyvnenia akýmkoľvek predchádzajúcim výsledkom na rovnakej alebo podobnej vzorke. Presnosť môže byť vyjadrovaná tiež ako **opakovateľnosť** alebo **reprodukovateľnosť** metódy [65, s. 146].

Opakovateľnosť je tesnosť zhody medzi po sebe nasledujúcimi výsledkami merania tej istej meranej veličiny za tých istých podmienok (rovnaká použitá metóda, rovnaké laboratórium a zariadenia, rovnaká vzorka, rovnaký pracovník a krátke časové rozmedzie). Opakovateľnosť sa stanovuje za cieľom kvantifikácie náhodnej chyby [64, s. 146], [65, s. 8].

Reprodukovateľnosť je definovaná ako rozdiel medzi hodnotami po sebe nasledujúcich výsledkov merania rovnakej vzorky. Jednotlivé skúšky sú však vykonávané za rôznych podmienok (iný pracovník, zariadenie, miesto, čas ale rovnaká metóda). Najčastejšie sa to realizuje medzi dvoma laboratóriami, ktoré si navzájom porovnávajú výsledky [64, s. 146].

3.3.3 Lineárnosť

Lineárnosť vyjadruje schopnosť metódy poskytnúť prijateľnú lineárnu koreláciu medzi koncentráciou analytu vo vzorke a odozvou detektora. Lineárnosť teda hovorí o závislosti signálu detektora na koncentrácií analytu. Všeobecne sa jedná o priamkovú závislosť. Lineárnosť sa vyjadruje matematickou rovnicou:

$$y = kx + q \quad (5)$$

kde q je úsek na ose y a parameter k je smernica kalibračnej priamky. Pri výpočte hodnôt q a k sa využíva metóda najmenších štvorcov [64, s. 149–150].

3.3.4 Limit detekcie a stanoviteľnosti

Limit detekcie (*limit of detection, LOD*) odpovedá najmenšej koncentrácii stanovovaného analytu, ktorého analytický signál je štatisticky významne odlišný od šumu. Limit stanoviteľnosti (*limit of quantification, LOQ*) zase odpovedá koncentrácii, pri ktorej je možné

kvantitatívne vyhodnotenie s prijateľnou presnosťou a správnosťou. Tieto hodnoty sa dajú matematicky vypočítať pomocou hodnoty šumu (výška píku) a smernice (b) podľa rovníc:

$$LOD = \frac{3 \times \text{šum}}{b} \quad (6)$$

$$LOQ = \frac{10 \times \text{šum}}{b} \quad (7)$$

LOQ je väčšinou prvým bodom kalibračnej krivky [64, s. 151–152].

3.3.5 Selektivita a špecifita

Selektivita je schopnosť danej metódy dokázať stanoviť príslušné jednotlivé analyty v zložitej zmesi bez toho, aby iné zložky (matrica) ovplyvňovali výsledok analýzy. Týka sa to mnohozložkovej analýzy. Jednozložková analýza, ktorá je vzťahovaná len na stanovenie jedného analytu bez vplyvu matrice, má schopnosť nazývanú špecifita. Určujú sa porovnaním výsledkov analýzy získaných s čistým analytom a za prítomnosti všetkých predpokladaných reálnych rušivých zložiek v množstvách odpovedajúcich reálnej matrici [67, s. 9].

3.3.6 Robustnosť

Robustnosť je miera schopnosti metódy stanoviť správne a presné výsledky aj pri malých zmenách pracovných podmienok. K týmto zmenám dochádza behom bežnej analýzy aj pri dodržovaní pracovného postupu. Sú to napr. ľudský faktor, malé zmeny v pH roztokov, výkyvy teploty, opotrebovanie kolóny, stabilita analytu vo vzorke a pod [67, s. 22].

3.4 Vývoj validácie

Validácia metódy pozostáva z troch krokov:

- charakterizácia metódy, ktorá zahŕňa určenie parametrov,
- porovnanie parametrov metódy s požiadavkami na kvalitu výsledkov,
- ukončenie validácie, ak sa objektívne dokáže, že sú splnené požiadavky kvality, ktoré sa na výsledky merania kladú.

4 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Pred zahájením analýzy študovaných bioaktívnych látok bola urobená dôkladná literárna štúdia, ktorá poskytla prehľad chromatografických podmienok, pri ktorých boli tieto látky analyzované. Cieľom bol získať prehľad o používaných kolónach, mobilných fázach a detektoroch. Získané údaje sú zhrnuté v Tab. 2. až v Tab 7. ktoré uvádzajú chromatografické podmienky analýzy rutínu, hesperidínu a naringínu, dihydrokumarínu, escínu, hypericínu a eskulínu.

Tab. 2. Chromatografické podmienky analýzy rutínu uvedené v publikáciach [68, s. 154–155], [69, s.487], [70, s. 113], [71, s. 88], [72, s. 705]

Typ elúcie	Mobilná fáza	Typ kolóny a jej teplota	Typ detektora	Prietok mobilnej fázy [ml/min]	Referencie
izokratická	ACN, kyselina octová	Diaspher-110-C18	UV-VIS, 352 nm	0,7	V. I. Deineka et al. (2004)
gradient	voda, ACN	A Spherio-sorb ODS-2	UV-VIS, 210 nm	0,8	Eun Jin Lee et al. (2010)
gradient	ACN, voda-ortofosforečná kyselina (99,5:0,5)	C18 Ascentis Express; 30 °C	DAD, 220-450 nm	1,4	Agnieszka Kicel et al. (2015)
izokratická	ACN, voda (85:15)	Hypersil C18; 15 °C	UV-VIS, 254 nm	1,0	Jianqing Liao et al. (2015)
gradient	ACN, 0,4% kyselina octová	Spherisorb ODS2; 25 °C	DAD, 254 nm	1,0	Shujing Jiang et al. (2015)

Tab. 3. Chromatografické podmienky analýzy naringínu a hesperidínu uvedené v publikáciách [73, s. 5378], [74, s. 6554], [75, s. 2], [76, s. 108, 111], [77, s. 2], [78, s. 512], [79, s. 244]

Typ elúcie	Mobilná fáza	Typ kolóny a jej teplota	Typ detektora	Prietok mobilnej fázy [ml/min]	Referencie
gradientová	ACN, voda	Dikma Diamonsil C18; 25 °C	UV-VIS, 283 a 330 nm	1,0	GuoDong Zheng et al. (2009)
gradientová	0,1% kyselina trifluóroctová, metanol	LUNA C18; 35 °C	DAD, me- dzi 190 a 400 nm	1,0	Jin Bae Weon et al. (2012)
izokratická	tetrahyd- rofurán, voda, kyselina octová (21:77:2)	Nucleosil C8; 34 °C	UV-VIS, 280 nm	0,85	Feras Imad Kanaze et al. (2003)
gradientová	ACN, 2% kyselina octová	Spherisorb ODS; 40 °C	DAD, 285 nm	1,0	S. Gorinstein et al. (2006)
izokratická	ACN, 5 mM amó- nium acetát (25:75)	Eurospher 100 C18; 40 °C	UV-VIS, 285 nm	1,0	Silvia Marten (2007)
gradientová	ACN, voda	Symmetry C18; izbová teplota	DAD, 280 nm	1,0	Sun Yinshi et al. (2010)
gradientová	metanol, 1% kyselina octová	Purospher STAR C18; 25 °C	DAD, 240 a 280 nm	0,3	Lidércia C. R. Cerqueira e Silva et al. (2014)

Tab. 4. Chromatografické podmienky analýzy dihydrokumarínu uvedené v publikáciach [24, s. 740, 742], [80, s. 2], [81, s. 161]

Typ elúcie	Mobilná fáza	Typ kolóny a jej teplota	Typ detektora	Prietok mobilnej fázy [ml/min]	Referencie
gradient	ACN s 0,05% kyselinou mravčou, voda	C18 XBridge; 25 °C	MS	200	Joao C. Gasparretto et al. (2011)
izokratická	voda, metanol, ACN, kyselina mravčia (65:30:5:1)	Zorbax Eclipse XDB C18	DAD, 274 nm	1,0	Joao C. Gasparretto et al. (2011)
gradient	ACN, 0,1% kyselina octová	Zorbax Eclipse XDB C18; 35 °C	MS	0,4	Yang Rongjing et al. (2012)

Tab. 5. Chromatografické podmienky analýzy escínu uvedené v publikáciách [82], [83, s. 273, 375], [84, s. 243–244]

Typ elúcie	Mobilná fáza	Typ kolóny a jej teplota	Typ detektora	Prietok mobilnej fázy [ml/min]	Referencie
izokratická	ACN, 0,10% kyselina fosforečná (42:58)	SinoChrom ODS BP C18; 30 °C	DAD, 203 nm	1,0	Chen Junhui et al. (2007)
gradient	ACN, 0,2% kyselina fosforečná	Hypersil C18; 30 °C	UV-VIS, 203 nm	1,0	(2009)
izokratická	10 mM octan amónny, ACN-metanol (50:50) (40:60)	HC-C18; 25 °C	MS	1,0	Mengliang Zhang et al. (2011)

Tab. 6. Chromatografické podmienky analýzy hypericínu uvedené v publikáciach [85, s. 90], [86, s. 546], [87, s. 1013], [88, s. 599], [89, s. 4689]

Typ elúcie	Mobilná fáza	Typ kolóny a jej teplota	Typ detektora	Prietok mobilnej fázy [ml/min]	Referencie
izokratická	ACN, 0,1% kyselina fosforečná (90:10)	RP C18; izbová teplota	UV-VIS, 273 nm FL, 315 a 590 nm	1,5	Gerlie C. de los Reyes et al. (2002)
izokratická	metanol, 1,56%, fosfátový pufer, etyl acetát (4:1,9:1)	Hypersily ODS2; 35 °C	UV-VIS, 590 nm	1,0	Chen ML et al. (2003)
gradient	metanol-ACN (5:4), 0,1 M triethylamónium acetát	Superspher RP C18;	UV-VIS, 590 nm	1,0	Lauro Nuevas-Paz et al. (2004)
gradient	0,01 M triethylamónium acetátový pufer, metanol-ACN (5:4)	RP C18, 25 °C	FL, 236 nm	1,5	Sonja Gadzovska et al. (2005)
izokratická	ACN, metanol, 10 mM amónium acetát (54:36:10)	RP C18	UV-VIS, 590 nm	1,0	A. Kamal et al. (2012)

Tab. 7. Chromatografické podmienky analýzy eskulínu uvedené v publikáciach [90, s. 869], [91, s. 119], [92, s. 1322], [93, s. 235]

Typ elúcie	Mobilná fáza	Typ kolóny a jej teplota	Typ detektora	Prietok mobilnej fázy [ml/min]	Referencie
izokratická	metanolu, 0,1% kyselina fosforečná (30:70)	SUPELCOSI L LC-18-DB; 30 °C	UV-VIS, 357 nm	0,9	Zhihon Shi et al. (2007)
izokratická	Metanol, voda, ľadová kyselina octová (30:70:0,1)	Hibar C18; izbová teplota	UV-VIS, 342 nm	1,0	Achyut Bhara- dwaj S. et al. (2011)
izokratická	metanol, voda (70:30)	Acclaim C30	UV-VIS, 222 nm	1,0	Rehana Hamid et al. (2014)
gradient	0,075% kyselina octová, ACN	RP C18	UV-VIS, 338 nm	1,0	Shaheed Re- hman et al. (2015)

Z vyššie uvedeného prehľadu je možno vidieť, že pri analýze bioaktívnych látok sú predovšetkým používané kolóny typu C18 a mobilná fáza pozostáva zo zmesi acetonitrilu, resp. metanolu s puframi alebo vodou s prídavkom organických kyselín ako napr. kyselina octová alebo mravčia. Podľa účelu sú k detekcii používané detektory UV-VIS alebo DAD. Pri podrobných analýzach, kde sa v rastlinných extraktoch stanovujú aj látky zastúpené v malých množstvách, sa na detekciu využíva aj hmotnostný spektrometer.

5 CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bolo vypracovanie prehľadu, ktorý sa zaoberá bioaktívnymi látkami z vybraných rastliných extraktov, ich chemickou štruktúrou a farmakologickými vlastnosťami. Ďalšou úlohou bolo v experimentálnej časti vyvinúť metódu pre analýzu týchto bioaktívnych látok a ich kvantitatívne a kvalitatívne stanovenie a následné spracovanie a vyhodnotenie dát. Pre stanovenie je využitá separačná metóda HPLC s UV-VIS a DAD detektorom.

II. PRAKTICKÁ ČASŤ

6 PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE A POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

6.1 Prístrojové vybavenie

Na vývoj metódy bol použitý modulárny kvapalinový chromatograf pozostávajúci z nasledujúcich častí:

- čerpadlo Waters 600E (Waters),
- odplyňovač mobilnej fázy DeltaChrom™ VD 040 (Watrex),
- dávkovací ventil so sľučkou 20 μ l (Rheodyne),
- detektor UV 200 DeltaChrom™ (Watrex),
- program Clarity pre zber a vyhodnocovanie dát (Chromservis).

Po vyvinutí metódy bola analýza dokončená na chromatografe Prominence UFLC od Shimadzu. Chromatografický systém bol zložený z jednotlivých komponent:

- čerpadlo LC-20AD (Shimadzu),
- odplyňovač DGU-20A5R (Shimadzu),
- autosamplér SIL-20A HT (Shimadzu),
- termostat CTO-20AC (Shimadzu),
- detektor diodového podla SPD-20A (Shimadzu),
- analytická kolóna XSelect® CSH™ C18 5 μ m (4,6 x 250 mm) (Waters),
- program LabSolution (Shimadzu).

6.2 Použité chemikálie a štandardy

6.2.1 Štandardy

Eskulín hydrát ($\geq 98,0\%$, HPLC), (Sigma-Aldrich),

Hesperidín ($\geq 80\%$), (Sigma-Aldrich),

Rutín hydrát ($\geq 94\%$, HPLC), (Sigma-Aldrich),

Naringín ($\geq 95\%$, HPLC), (Sigma-Aldrich),

Dihydrokumarín (99%), (Sigma-Aldrich),

Escín ($\geq 95\%$), (Sigma-Aldrich),

Hypericín (Labicom s.r.o.).

6.2.2 Vzoroky

Etanolický extrakt z komunice lekárskej,
Etanolický extrakt z ľubovníka bodkovaného,
Olejový extrakt z ľubovníka bodkovaného.
Etanolický extrakt z pagaštanu konského,
Glycerolový extrakt z grepu,
Etanolický extrakt z pohánky tatárskej.
Extrakty dodala firma Nobilis Tilia s.r.o.

6.2.3 Chemikálie

Acetonitril pre HPLC, (Chem-Lab),
Metanol pre HPLC, (PENTA),
Kyselina octová ($\geq 99,98\%$), (PENTA),
Amónium acetát, (Chemapol),
Metylparabén ($> 99\%$), (Fluka),
Etylparabén ($> 99\%$), (Fluka),
Propylparabén ($> 99\%$), (Fluka),
Butylparabén ($> 99\%$), (Fluka),
Benzyl 4-hydroxy benzoát ($> 99\%$), (Fluka).

Pre celistvosť práce boli namerané UV-VIS absorpčné spektrá štandardov na prístroji DataB photoLab 6600 UV-VIS. Následne boli tieto spektrá vyhodnotené.

6.3 Príprava roztokov

Roztoky pre jednotlivé analýzy sa pripravovali rozpustením štandardov v metanole. Pôvodné rozpúšťadlo, 0,5% kyselina octová a acetonitril v pomere 85:15, bolo zmené z dôvodu zlej rozpustnosti rutínu a hesperidínu vo vyšších koncentráciach. Zmenou rozpúšťadla sa nezmenila účinnosť separácie.

6.3.1 Příprava roztokov pre kalibráciu a validáciu linearity

Navážením jednotlivých štandardov (**125 mg**) a rozustením v metanole sa pripravilo **250 ml** zmesného zásobného roztoku (rutín, hesperidín, naringín, dihydrokumarín a eskulín) o koncentrácií **500 mg/l**. Potom sa tento roztok riedil na jednotlivé koncentrácie vid'. Tab. 8. Pred nástrekom boli roztoky prefiltrované cez filter o hrúbke 0,22 μm (Millipore).

Pre escín sa pripravil **10 ml** zásobný roztok o koncentrácií **1000 mg/l** rozpustením návažky (**10 mg**) v metanole. Tento roztok sa ďalej riedil. Riedením bolo získané 8 roztokov o objeme 5 ml a koncentrácií 1000 mg/l až 20 mg/l. Pred nástrekom boli roztoky prefiltrované cez filter o hrúbke 0,22 μm .

Koncentrácie kalibračných roztokov hypericínu sa pohybovali v rozmedzí 128 mg/l až 0,6 mg/l. Do 25 ml odmernej banky sa pripravil zásobný roztok hypericínu o koncentrácií 128 mg/l. Tento roztok sa ďalej riedil. Pre koncentrácie 1 mg/l a 0,6 mg/l bol pre riedenie použitý roztok o koncentrácií 2,5 mg/l.

Tab. 8. Koncentrácie kalibračných roztokov

Kalibračné roztoky					
Zmes		Escín		Hypericín	
Koncentrácia [mg/l]	Pipetovaný objem [ml]	Koncentrácia [mg/l]	Pipetovaný objem [ml]	Koncentrácia [mg/l]	Pipetovaný objem [ml]
500	5	1000	5	128	5
400	4	750	3,8	64	2,5
300	3	500	2,5	32	1,25
200	2	250	1,3	16	0,6
100	1	100	0,5	6,4	0,3
20	0,5	50	0,3	2,5	0,1
25	0,25	30	0,2	1	2
20	0,2	20	0,1	0,6	1,2

6.3.2 Příprava roztokov pre validáciu opakovateľnosti, presnosti a správnosti

Pre stanovenie opakovateľnosti boli pripravené roztoky študovaných extraktov. Pripravoval sa jeden zásobný roztok pre každý extrakt. Jednotlivé extrakty sa riedili do 5 ml odmernej baniek roztokom metanolu a 0,5% kyseliny octovej v pomere 50:50. Pipetované

množstvá extraktov môžeme vidieť v Tab. 9. Každý roztok sa nastrekoval na kolónu 6 krát v krátkom časovom úseku.

Presnosť a správnosť boli stanovené metódou štandardného prídavku. Pripravovali sa 3 roztoky pre každý extrakt z ktorých sa každý nastrekoval na kolónu tri krát. Roztoky extraktov sa ďalej riedili do 5 ml odmerných bánk vid' Tab. 9. Riedili sa roztokom metanolu a 0,5% kyseliny octovej v pomere 50:50 do ktorého bol pridaný príslušný štandard.

Tab. 9. Riedenie extraktov a návažky štandardov pre stanovenie presnosti a správnosti

Extrakt	Pipetovaný objem extraktu [ml]	Pužitý štandard	Návažka štandardu [g] na objem 10 ml
komunica	2	escín	0,0004
gaštan	3	escín	0,1513
pohánka	2	rutín escín	0,0136 0,0002
ľubovník	2	rutín escín	0,0017 0,0001
grep	1	naringín hesperidín	0,0176 0,0045

6.3.3 Príprava roztoku z olejového extraktu ľubovníka

Olejový extrakt bol navážený priamo do deliaceho lievika. Extrakt sa následne tri krát vytrepával do 20 ml metanolu. Výtrepky sa potom premiestnili pomocou pipety do srdcovej banky. Tam sa nechali 3 hodiny stát a následne sa prefiltrovali cez síran sodný do odparovacej banky. V nej boli zakoncentrované za teploty kúpele 40 °C na vákuovej odparke.

7 VÝSLEDKY A DISKUSIA

7.1 Vývoj metódy

Vývoj metódy spočíval predovšetkým vo výbere správnej kolóny, zložení mobilnej fázy, vhodného gradientu a vlnovej dĺžky pri detekcii stanovovaných látok. Cieľom bolo vyvinúť metódu, kde by boli píky jednotlivých analytov ideálne separované, rozlíšiteľné a symetrické s ohľadom na retenčný čas.

7.2 Vývoj analytickej metódy pre stanovenie hesperidínu, eskulínu, naringínu, dihydrokumarínu a rutínu

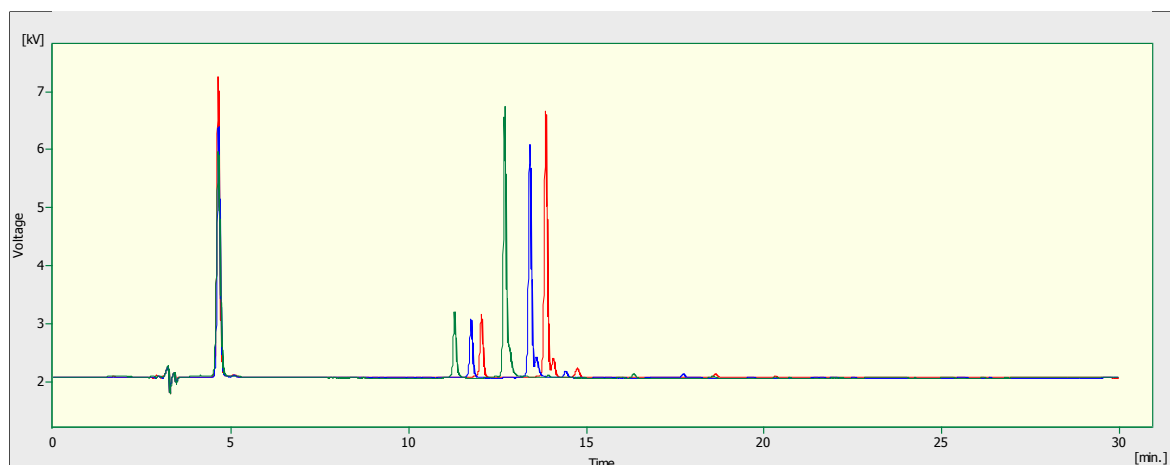
Na počiatku vývoja metódy sa pripravili roztoky o koncentrácií 5 mg/ 100 ml. Štandardy boli rozpustené vo zmesi 0,5% vodného roztoku kyseliny octovej a acetonitrilu v pomere 85:15. Absorbancia týchto roztokov bola následne premeraná na UV-VIS spektrometre, aby sa pre jednotlivé štandardy zistila optimálna vlnová dĺžka. Potom sa jednotlivé štandardy nastrekovali na kolónu. Kolóna sa premývala mobilnou fázou zloženou z 0,5% kyseliny octovej a acetonitrilu v pomere 85:15, aby sa zistil približný retenčný čas týchto štandardov. Po týchto prvotných zisteniach sa pripravila zmes, ktorá obsahovala všetky vyššie uvedené štandardy: rutín, hesperidín, naringín, dihydrokumarín a eskulín. Koncentrácia každého štandardu v zmesi bola 5 mg/100 ml a rozpúšťadlom bola znovu 0,5% kyselina octová a acetonitril v pomere 85:15. Následne sa skúšali rôzne metódy, ktoré by viedli k uspokojivej separácii všetkých uvedených analytov. Metódy 1 až 4 boli vykonané za podmienok uvedených v Tab. 10. pričom sa líšili gradientmi, ktoré sú uvedené v Tab. 11 a chromatogramy získané pri týchto analýzach sú zvedené na Obr. 12 a 13.

Tab. 10. Chromatografické podmienky analýzy I

Kolóna XSelect® CSH™ C18 5 µm (4,6 x 250 mm)	
Stanovovaná látka	rutín, hesperidín, naringín, dihydrokumarín a eskulín
Mobilná fáza	A-0,5% vodný roztok kyseliny octovej B-acetonitril C-metanol
Typ elúcie	gradient
Vlnová dĺžka	285 nm

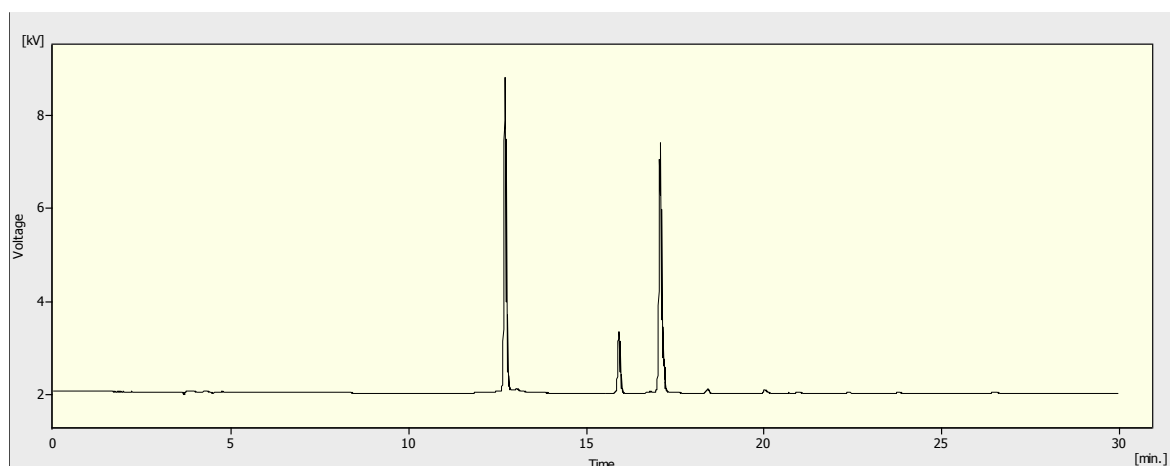
Tab. 11. Gradienty použité při vývoji analytické metody I

Metóda	Prietok mobilnej fázy [ml/min]	Čas [min.]	Gradient mobilnej fázy	
			A	B
1	1,0	0	85	15
		30	25	75
2	1,0	0	85	15
		30	35	65
3	1,0	0	85	15
		30	40	60
4	1,0	0	100	0
		5	85	15
		30	25	75
		35	85	15
5	0,8	0-10	80	20
		10-14	63	37
		14-25	63	37
6	0,5	0	80	20
		5	80	20
		10	40	60
		20	20	80
		40	40	60
7	0,8	50	80	20
		0	85	25
		20	65	35
		40	65	35
		60	50	50
		110	20	80
8	1,0	120	10	90
		0-15	100	0
		15-45	70	30
		45-50	0	100
		50-55	0	100
		60-90	100	0



Obr. 12. Chromatogram metód 1, 2 a 3 pri použití kolóny XSelect®

Pri gradiente metódy 1 (zelený chromatogram) môžeme vidieť nedostatočnú separáciu analytov. Naringín a hesperidín sa ziali do jedného píku a dihydrokumarín úplne chýba. Gradient bol upravený vid' gradient metódy 2 (modrý chromatogram). V metóda 2 sa znížil podiel acetonitrilu o 10 %. Znížením podielu organického rozpúšťadla sa znížila elučná sila a predĺžil sa retenčný čas. Dôsledkom toho sa predĺžil čas analytu v kolóne ale napriek tomu separácia nebola dostatočná. V metóde 3 (červený chromatogram) bol preto podiel acetonitrilu znížený o ďalších 5 %. Napriek tomu sa naringín a hesperidín nepodaril odseparovať. Tieto metódy nie sú vhodné pre použitie v praxi.



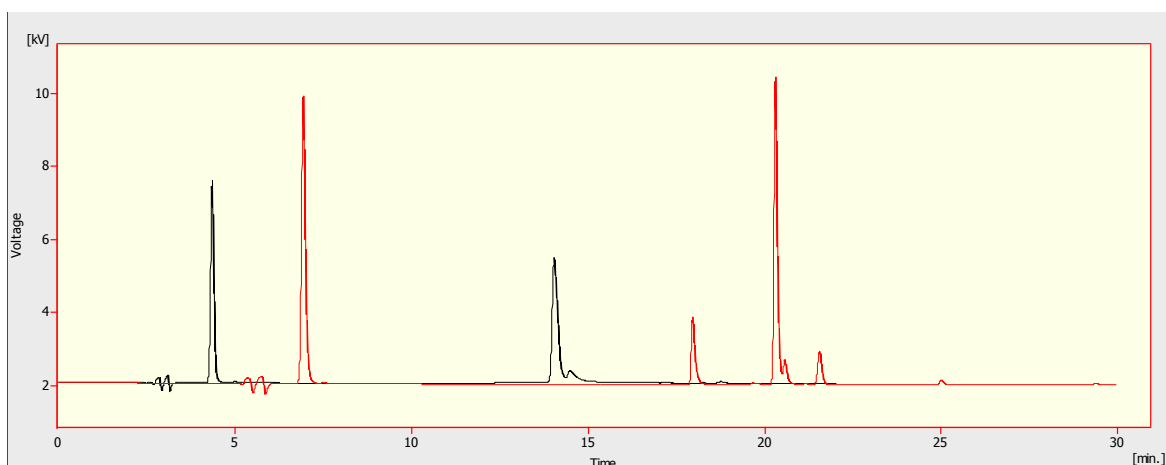
Obr. 13. Chromatogram metódy 4 pri použití kolóny XSelect®

Chromatogram metódy 4 je podobný jako pri predchádzajúcich metódach. Objavujú sa tu len 3 píky, pravdepodobne eskulín, rutín a naringín ktorý vychádza z kolóny s hesperidínom. V nasledujúcich metódach sa preto zisťovalo aké by na separáciu malo vplyv zníženie prietoku mobilnej fázy. Podmienky metód sú uvedené v Tab. 12 a ich gradienty sú uvedené v Tab. 11.

Tab. 12. Chromatografické podmínky analýzy II

Kolóna Kinetex 5 μ m C18 100A (250 x 4,6 mm)	
Stanovovaná látka	rutín, hesperidín, naringín, dihydrokumarín a eskulín
Mobilná fáza	A-0,5% vodný roztok kyseliny octovej B-acetonitril C-metanol
Typ elúcie	gradient
Vlnová dĺžka	285 nm

Na tejto kolóne boli zopakované metódy 1 a metóda 3 len prietok bol znížený na 0,8 ml/min. (čierny chromatogram) a následne až na 0,5 ml/min. (červený chromatogram). V chromatograme na Obr. 14 je vidieť pri vyššom prietoku čiastočnú separáciu. Pri nižšom prietoku 0,5 ml/min. sa objavil nový pík, pravdepodobne dihydrokumarín a hesperidín s naringínom zostali spojené. Metódy nie sú preto použiteľné pre analýzu týchto biologicky aktívnych látok. Tieto metódy 1 a 3 boli vyskúšané aj na kolóne **Spherisorb S5 ODS2** a kolóne **SUNFIRE™ C8 5 μ m**. Výsledok analýz na oboch kolónach bol neuspokojivý a separácia bola zlá. Použitie týchto kolón preto nie je vhodné.



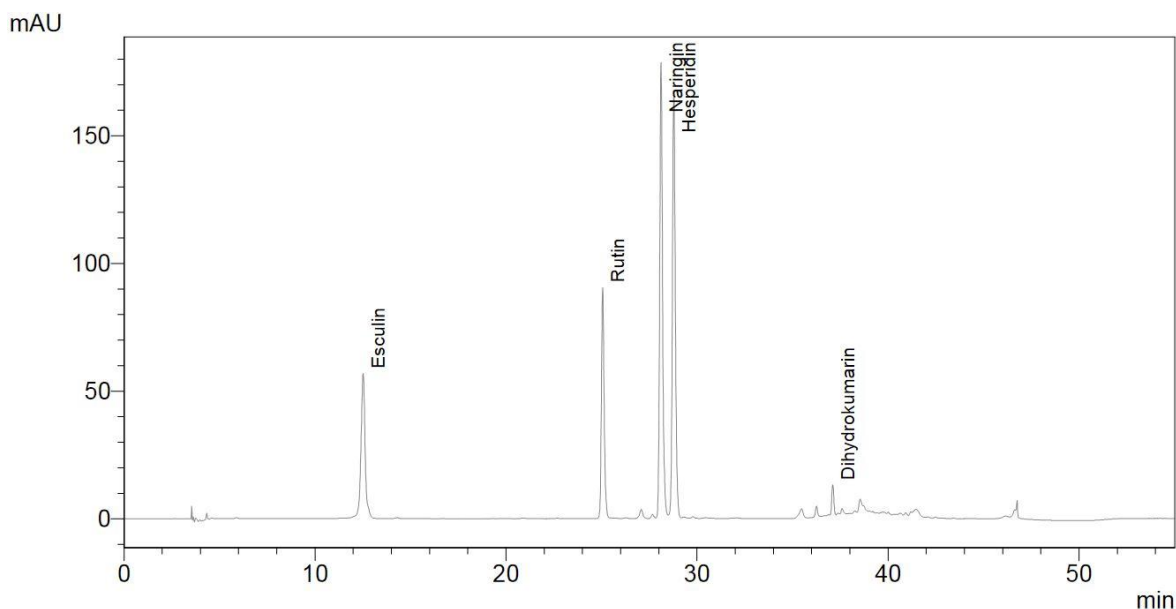
Obr. 14. Chromatogram metódy 3 so zníženým prietokom 0,8 ml/min. (čierny chromatogram) a 0,5 ml/min. (červený chromatogram) použiti kolóny Kinetex

Pri metóde 6 a 7 bola okrem dlhej doby analýzy taktiež nedostatočná separácia. Chromatografické píky štandardov sa zlievali a chvostovali. Pri metóde 8 bola prvý raz dosiahnutá úplna separácia analytov aj keď v časovo náročnejšej analýze. Metóda bola ďalej modifikovaná, bol čiastočne znížený celkový čas analýzy, upravil sa gradient a pre ešte lepšiu separáciu sa znížil prietok mobilnej fázy. Pristúpilo sa aj k zmene kolóny a výsledkom sú

podmienky uvedené v Tab. 13. Chromatogram štandardov z tejto metódy je zobrazený na Obr. 15.

Tab. 13. Výsledné chromatografické podmienky pre analýzu rutínu, hesperidínu, naringínu, dihydrokumarínu a eskulínu (Metóda I)

Výsledné podmienky analýzy (Metóda I)			
Stanovovaná látka	rutín, hesperidín, naringín, dihydrokumarín a eskulín		
Typ kolóny	XSelect® CSH™ C18 5 µm (4,6 x 250 mm)		
Mobilná fáza	A-0,5% vodný roztok kyseliny octovej B-acetonitril		
Prietok mobilnej	0,8 ml/min		
Vlnová dĺžka	190-370 nm		
Gradient	Čas [min.]	A	B
	0	5	95
	30	30	70
	35	100	0
	40	100	0
	45	5	95
	50	5	95



Obr. 15. Chromatogram zmesi štandardov rutínu, hesperidínu, naringínu, dihydrokumarínu a eskulínu analyzovaný metódou I

7.3 Vývoj analytickej metódy pre escín

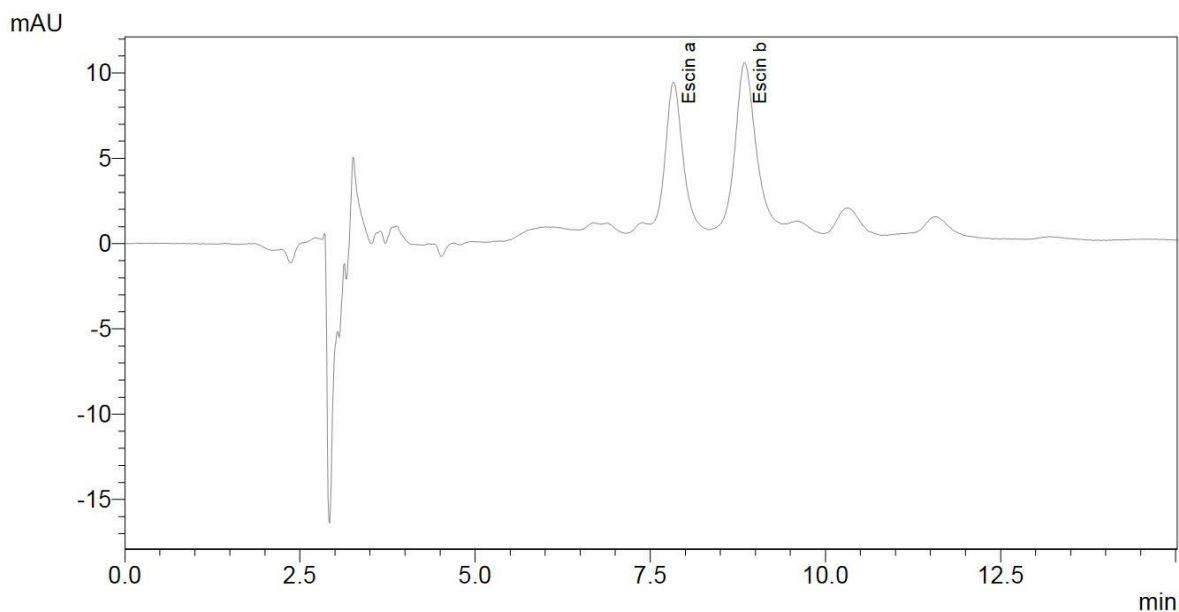
Roztok štandardu escínu o koncentrácii 5 mg/100 ml sa pripravil rozpustením v 0,5% kyseliny octovej a acetonitrilu v pomere 85:15. Najprv sme sa pokúsili escín stanoviť pomocou metódy I (stanovenie zmesi hesperidínu, eskulínu, naringínu, dihydrokumarínu a rutínu), ale kvôli jeho rozdielnej absorbančii pri danej vlnovej dĺžke sa to nepodarilo. Pri vývoji sa preto použila izokratická metóda a optimálna vlnová dĺžka 203 nm. Meranie sa robilo na kolóne XSelect® CSH™ C18 5 µm (4,6 x 250 mm) a ako mobilná fáza boli použité nasledujúce rozpúšťadlá: A je 0,5% vodný roztok kyseliny octovej, B je acetonitril, C je metanol a D je 10 mM amónium acetát. Jednotlivé testované metódy sú predstavené v Tab. 14 a výsledné chromatografické podmienky sú uvedené v Tab. 15. Chromatogram escínu je uvedený na Obr. 16 a je z neho vidieť, že štandard escínu dodaný Sigma-Aldrich sa vymýva v dvoch chromatografických pikoch a je teda zmesou escínu a a escínu b.

Tab. 14. Podmienky použité pri vývoji metódy II pre analýzu escínu. Rozpúšťadlo A je vodný roztok 0,5% kyseliny octovej, B je acetonitril, C je metanol a D je 10 mM amónium acetát.

Metóda	Prietok mobilnej fázy [ml/min]	A	B	C	D
1	1,0	90	10	0	0
2	0,8	0	42	58	0
3	1,0	0	20	80	0
4	0,8	0	27	27	46

Tab. 15. Výsledné chromatografické podmienky pre analýzu escínu (Metóda II)

Výsledné podmienky analýzy (Metóda II)				
Stanovovaná látka	escín			
Typ kolóny	XSelect® CSH™ C18 5 µm (4,6 x 250 mm)			
Mobilná fáza	B-acetonitril			
	C-metanol			
	D- 10 mM amónium acetát			
Prietok mobilnej	0,8 ml/min			
Vlnová dĺžka	203 nm			
Izokratická elúcia	Čas [min.]	B	C	D
	15	27	27	46



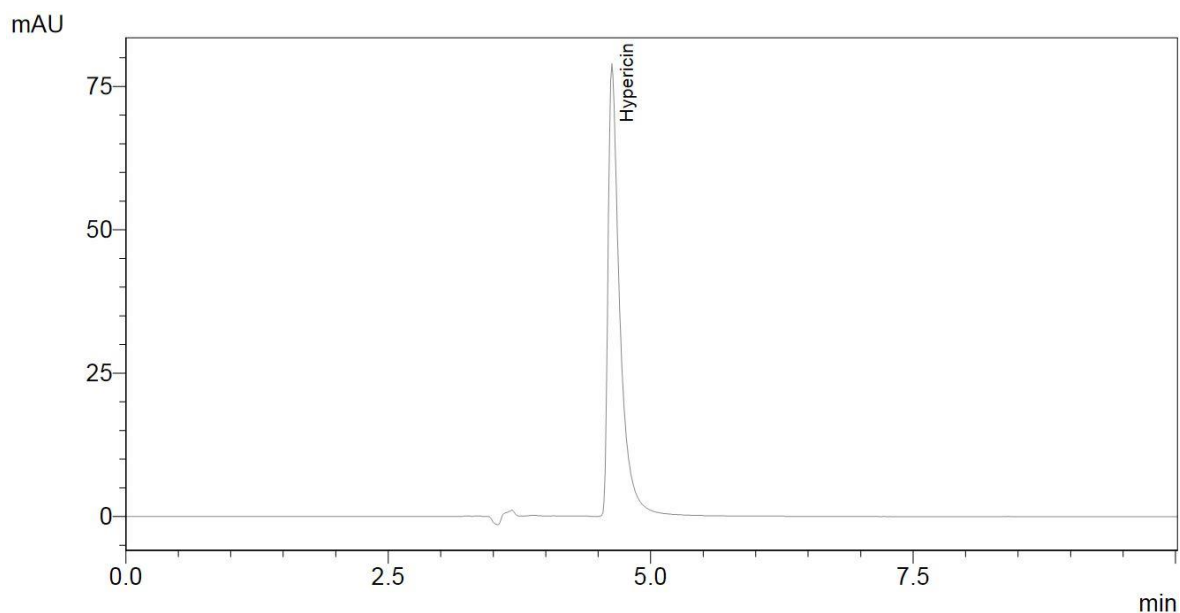
Obr. 16. Chromatogram štandardu escínu analyzovaný metódou II

7.4 Vývoj analytickej metódy pre hypericín

Pre analýzu sa pripravil zásobný roztok hypericínu o koncentracii 320 mg/l z ktorého sa následne pripravovali roztoky o koncentracii 64 mg/l. Rozpúšťadlom bol metanol. Analýza sa robila na kolóne XSelect® CSH™ C18 5 µm (4,6 x 250 mm) pri vlnovej dĺžke 590 nm. Najskôr bola vyskúšaná gradientová metóda, kde mobilná fáza pozostávala z metanolu (A), acetonitrilu (B) a 10 mM amónium acetátu (C). V čase 0 bol podiel rozpúšťadla A = 70 % a B = 30 %. V čase 15 minút A = 90 % a B = 10 %. Pomocou tejto metódy bol hypericín stanoviteľný, ale jeho pík chvostoval a rozdvojoval sa. Ďalšiu a konečnú, izokratickú metódu možno vidieť v Tab. 16.

Tab. 16. Výsledné chroamtografické podmienky pre analýzu hypericínu (Metóda III)

Výsledné podmienky analýzy (Metóda III)				
Stanovovaná látka	hypericín			
Typ kolóny	XSelect® CSH™ C18 5 µm (4,6 x 250 mm)			
Mobilná fáza	A-metanol			
	B-acetonitril			
	C- 10 mM amónium acetát			
Prietok mobilnej	0,8 ml/min			
Vlnová dĺžka	590 nm			
Izokratická elúcia	Čas [min.]	A	B	C
	10	36	54	10



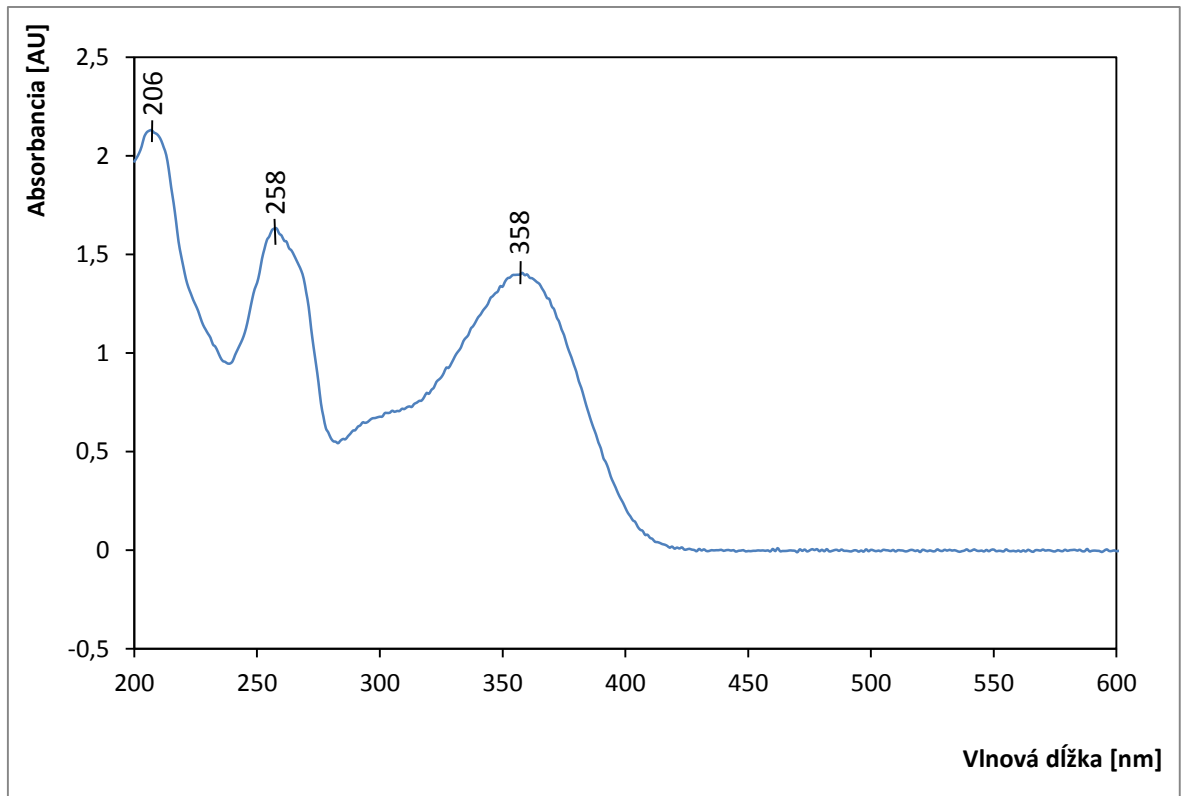
Obr. 17. Chromatogram štandardu hypericínu analyzovaný metódou III

7.5 Optimalizácia vlnovej dĺžky

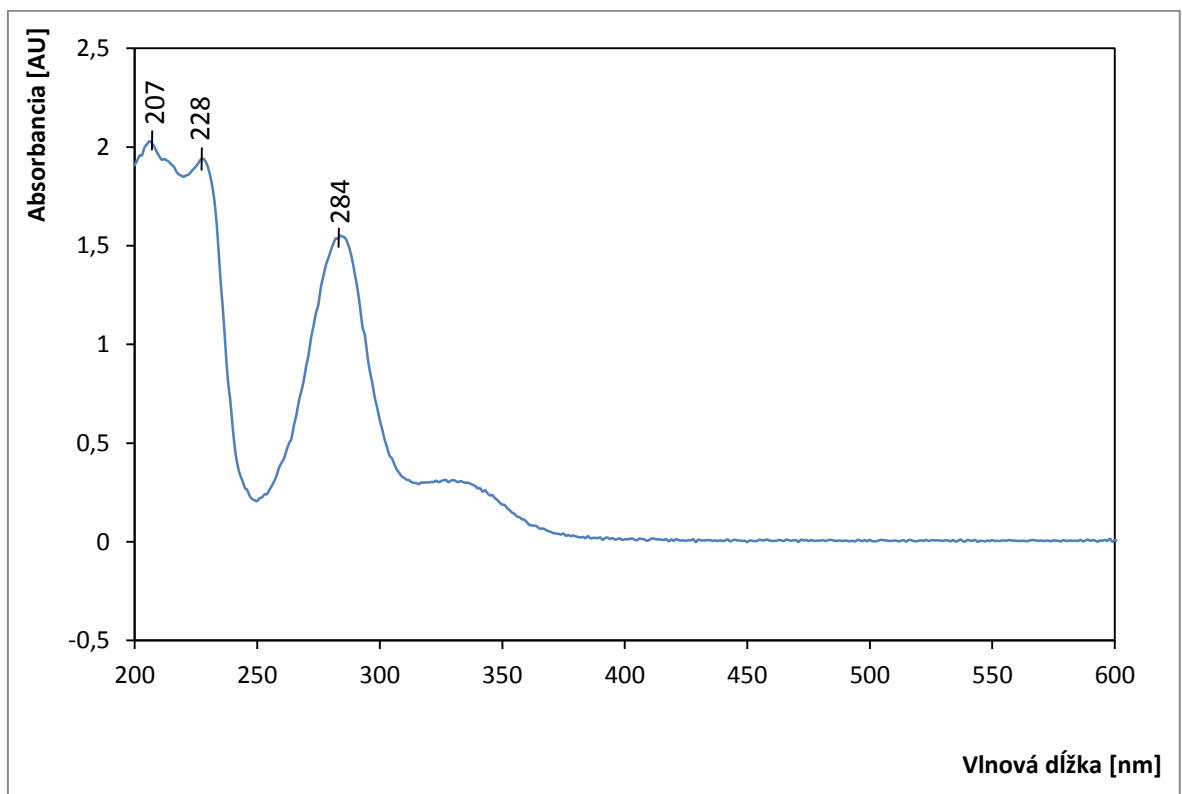
Vlnová dĺžka pre Metódu I (zmes rutínu, hesperidínu, naringínu, dihydrokumarínu a eskulínu) bola nastavená na 280 nm. Escín, ktorý sa stanovoval Metódou II sa detekoval pri 203 nm a hypericín ktorý sa stanovoval vlastnou metódou pri 590 nm. Toto nastavenie vychádzalo z údajov nájdených v literatúre. Pre celistvosť vývoja boli v rámci diplomovej práce namerané a vyhodnotené aj UV-VIS absorpčné spektrá, aby došlo k úplnej optimalizácii metódy. Absorpčné maximá pre jednotlivé bioaktívne látky sú uvedené v Tab. 17.

Tab. 17. Absorpčné maximá pre jednotlivé bioaktívne látky

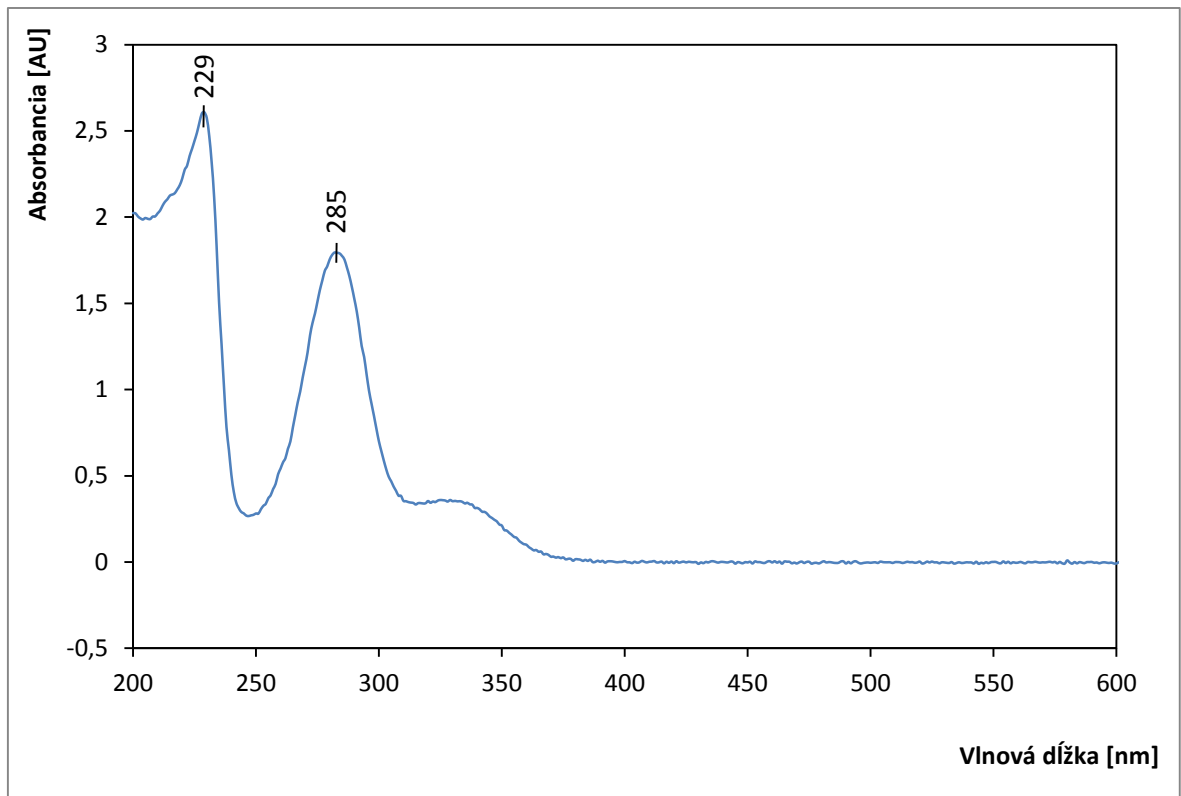
Štandardy	Absorpčné maximá λ [nm]			
rutín	206	258	358	
hesperidín	207	228	284	
naringín	229	285	-	
dihydrokumarín	225	256	-	
eskulín	208	225	335	
escín	202	-	-	
hypericín	220	285	547	588



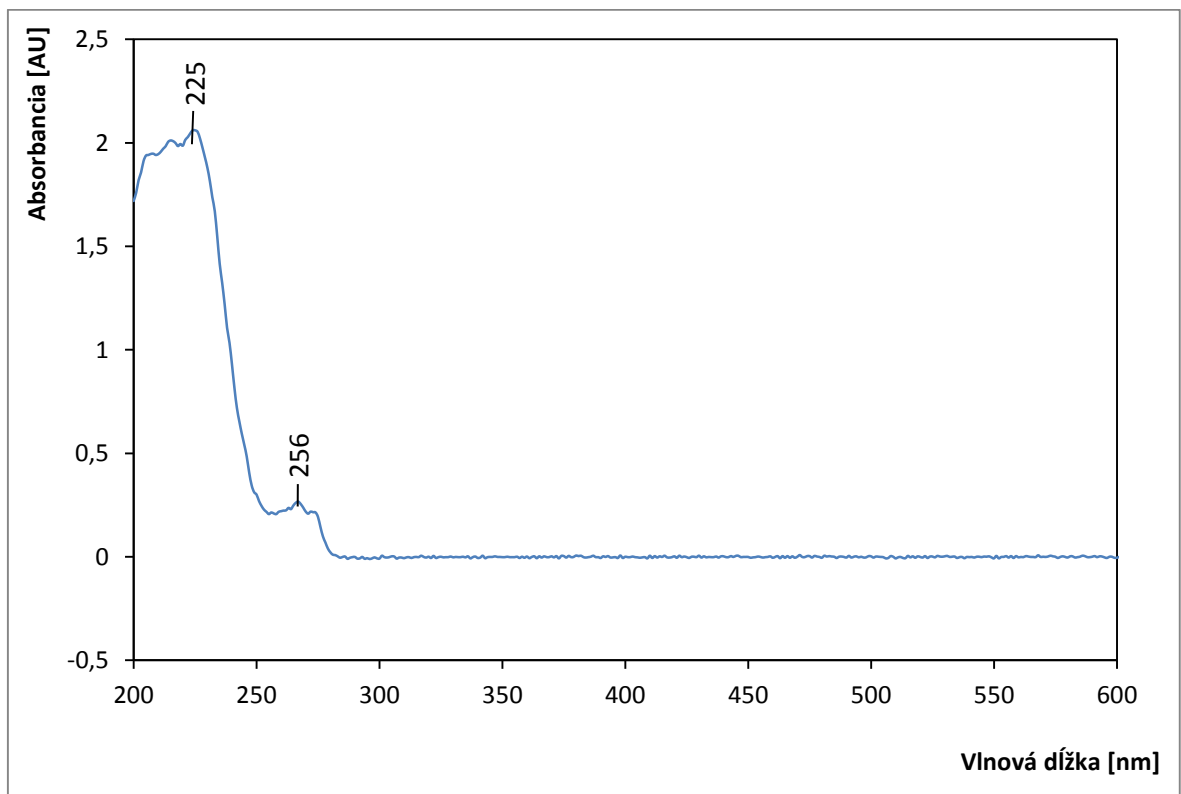
Obr. 18. Absorpční spektrum rutínu



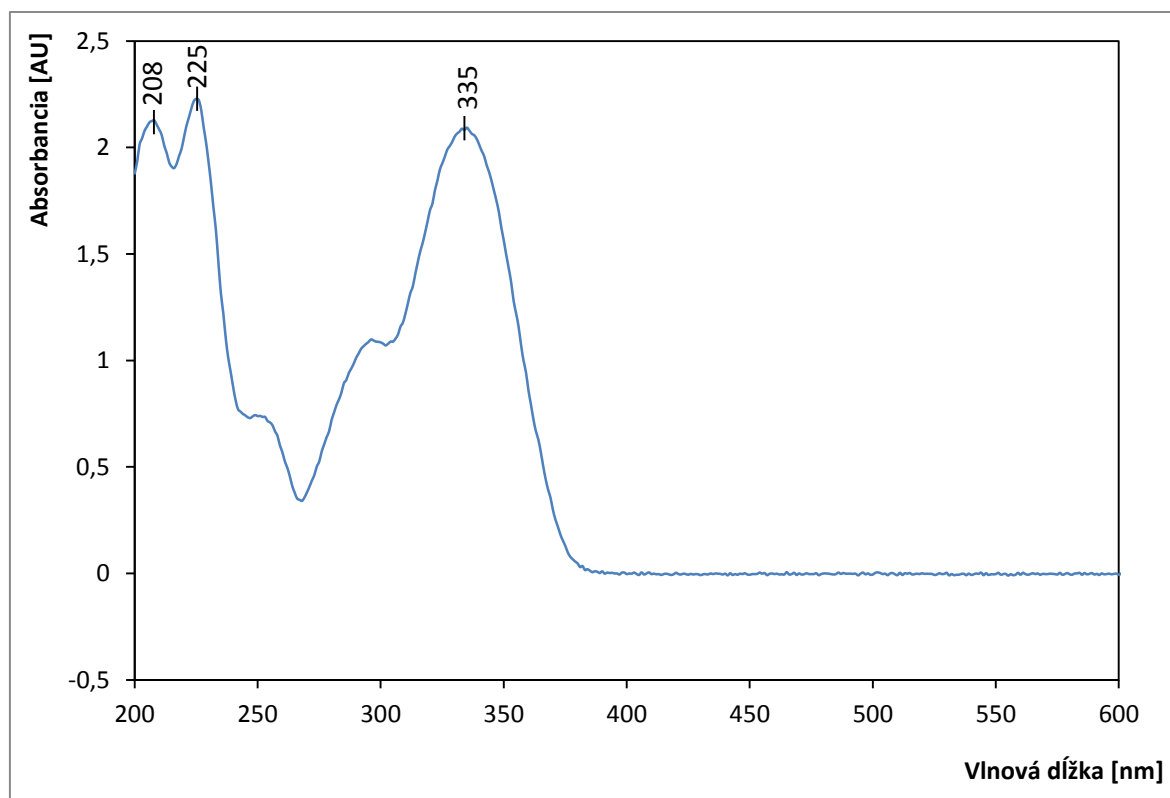
Obr. 19. Absorpční spektrum hesperidínu



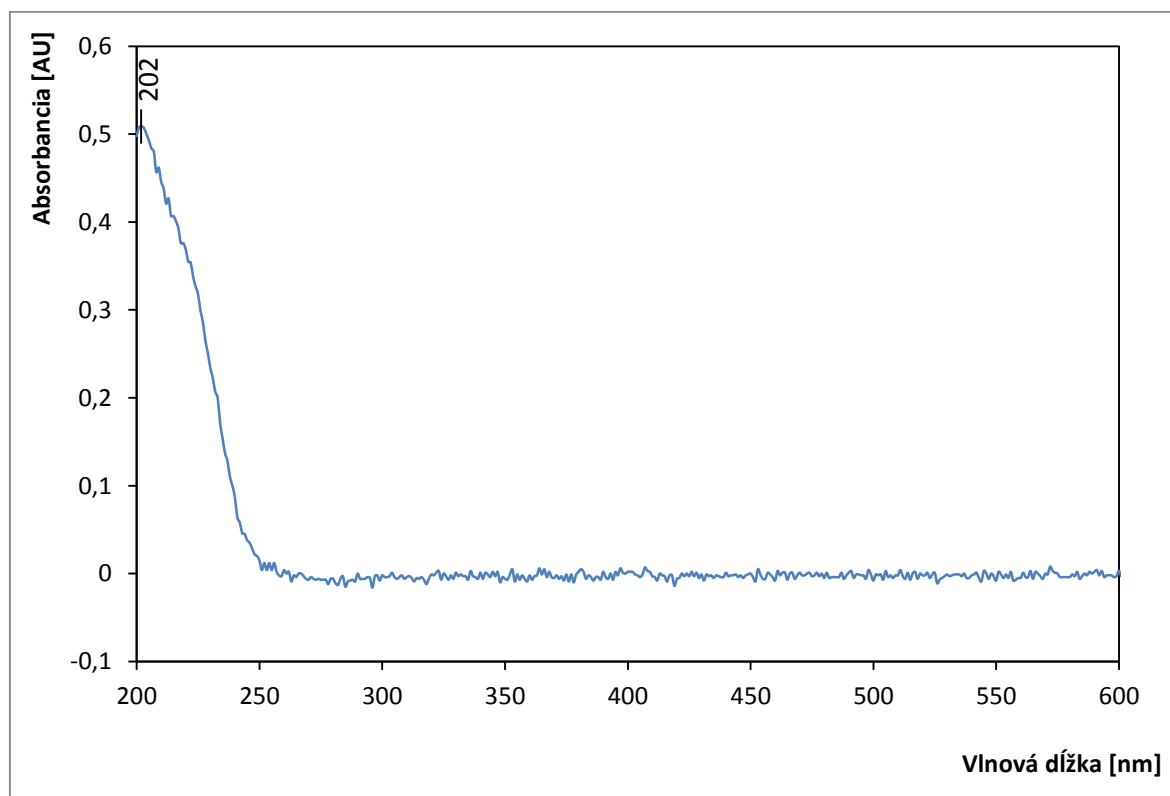
Obr. 20. Absorpční spektrum naringínu



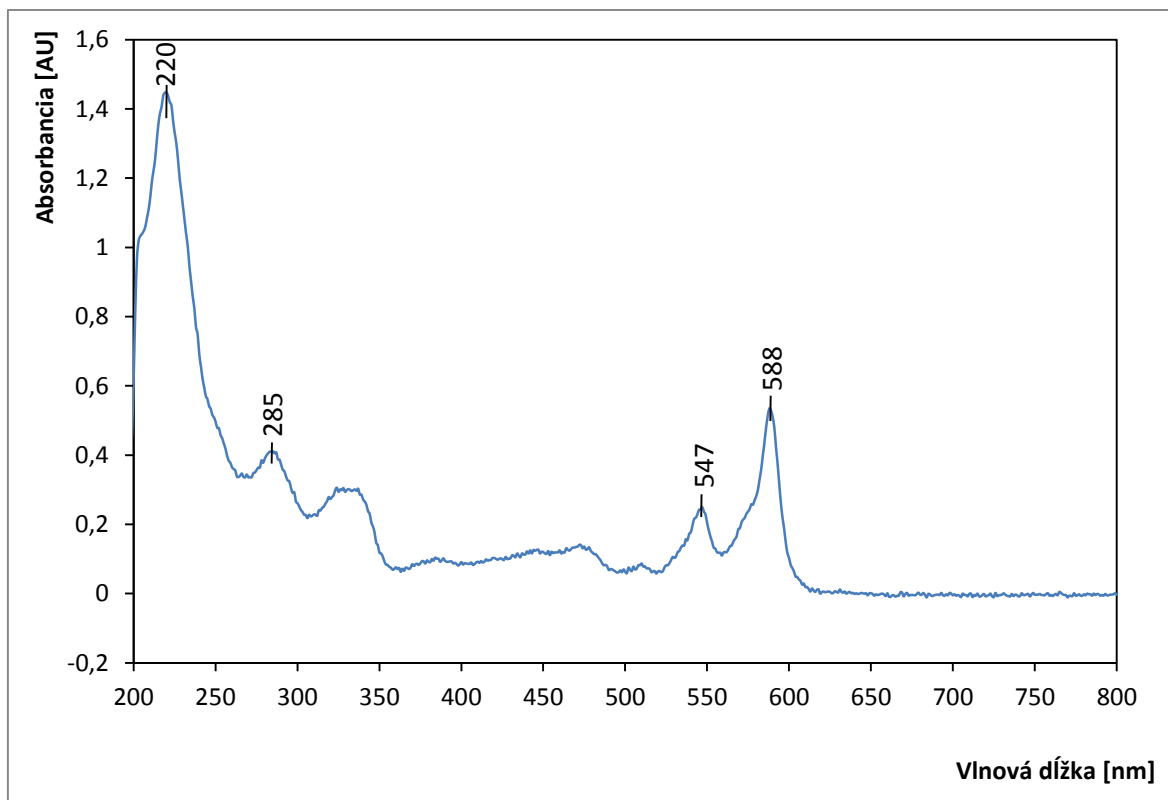
Obr. 21. Absorpční spektrum dihydrokumarínu



Obr. 22. Absorpční spektrum eskulínu



Obr. 23. Absorpční spektrum escínu



Obr. 24. Absorpční spektrum hypericínu

7.6 Test vhodnosti chromatografického systému

7.6.1 Test vhodnosti chromatografického systému

Test chromatografického systému zahŕňa výpočet teoretických poschodí, asymetrie pík a ich rozlíšenie. K výpočtom boli použité chromatogramy kalibračných roztokov o koncentrácii 100 mg/l.

7.6.2 Počet teoretických poschodí

Počet teoretických poschodí bol počítaný podľa vzorca:

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{w_{50}} \right)^2 \quad (8)$$

Tab. 18. Počet teoretických poschodí

Analyzovaná látka	t_R [min.]	w_{50}	N
hesperidín	28,78	0,162	174 842
eskulín	12,51	0,211	19 477
naringín	28,11	0,155	182 221
dihydrokumarín	37,10	0,122	512 344
rutín	25,1	0,147	160 979
escín a	7,5	0,245	5 186
escín b	8,43	0,292	4 613
hypericín	4,58	0,108	9 963

7.6.3 Asymetria pík

Asymetria pík bola počítaná podľa vzorca faktoru chvostovania:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad (9)$$

kde $w_{0,05}$ je šírka píku v 1/20 jeho výšky a d je vzdialenosť medzi kolmicou spustenou zo stredu vrcholu píku a vzostupnou časťou v 1/20 jeho výšky

Tab. 19. Asymetria píkov

Analyzovaná látka	w _{0,05}	d	As
hesperidín	0,375	0,159	1,18
eskulín	0,543	0,238	1,14
naringín	0,376	0,150	1,25
dihydrokumarín	0,23	0,103	1,12
rutín	0,348	0,141	1,23
escín a	0,318	0,132	1,20
escín b	0,776	0,334	1,16
hypericín	0,299	0,067	2,23

Všetky píky bioaktívnych látok s výnimkou hypericínu mali hodnotu asymetrie vyššiu ako 1 čo značí chvostovanie píkov, ale ležali do hodnoty 2 ktorá sa je určená ako hraničná. Hypericín mal hodnotu asymetrického faktoru 2,23 čo vyjadruje už značné chvostovanie.

7.6.4 Rozlíšenie píkov

Rozlíšenie píkov bolo počítané podľa vzorca:

$$R_s = \frac{1,18 \times (t_{R_2} - t_{R_1})}{(w_{50_1} + w_{50_2})} \quad (10)$$

Z chromatogramu zmesi štandardov (Obr. 15) je vidieť že píky jednotlivých štandardov sú dobre separované a tak netreba počítať ich rozlíšenie. Výnimku tvorí pík naringínu a hesperidínu, ktoré sa eluovali blízko seba. Rozlíšenie bolo teda počítané iba pre naringín a hesperidín. Ich rozlíšenie je 2,48 čo spĺňa podmienku že pri dobrej separácii má byť väčšie ako 1,5.

7.7 Validácia metód

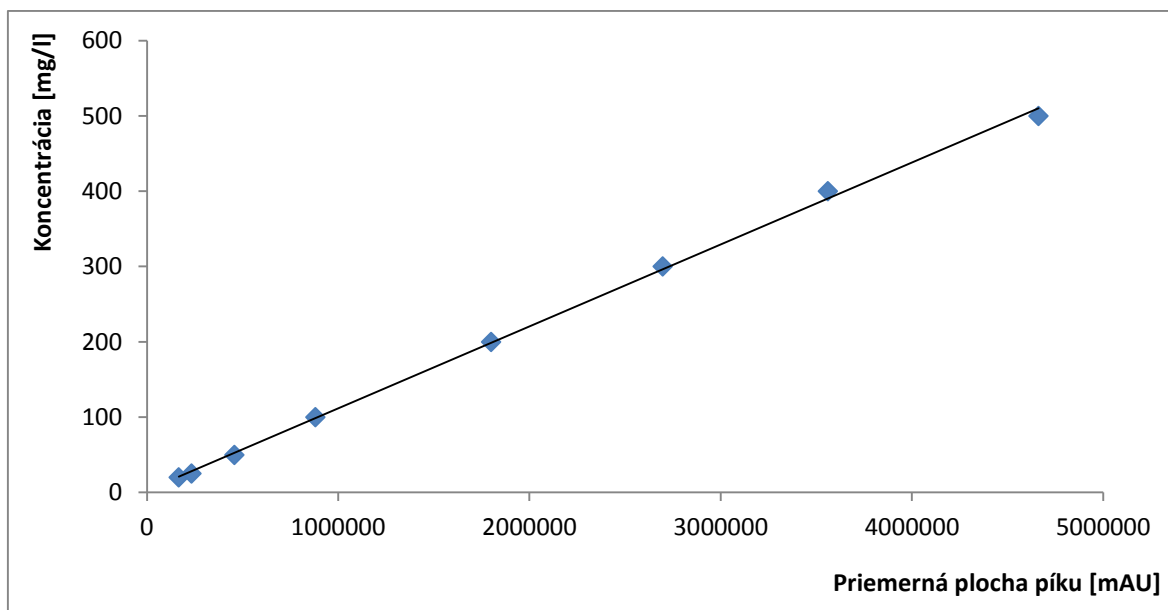
7.7.1 Linearita

Pre stanovenie linearity bolo použitých 8 roztokov o rôznej koncentrácii. Príprava roztokov je opísaná v kapitole 6.3.1. Každý roztok bol 3 krát nastreknutý na kolónu a pre každú koncentráciu bola vypočítaná priemerná plocha píku. Závislosť koncentrácie na ploche píku bola vyhodnotená metódou lineárnej regresie.

Kalibrační závislost' pre rutín

Tab. 20. Parametre lineárnej regresie pre rutín

Koncentrácia [mg/l]	Priemerná plocha píku [AU]	Štatistické parameter pre regresiu: $y = kx + q$	
20	166 585	Počet bodov	$n = 8$
25	234 063	Smernica	$k = 9\,179,45 \pm 118,06$
50	458 195	Abs. člen	$q = -22\,510,73 \pm 31\,055,29$
100	881 259	Korelačný koef.	$r = 0,9990$
200	1 799 956	Reziduálna odch.	$s = 57\,296$
300	2 697 603		
400	3 560 796		
500	4 662 687		

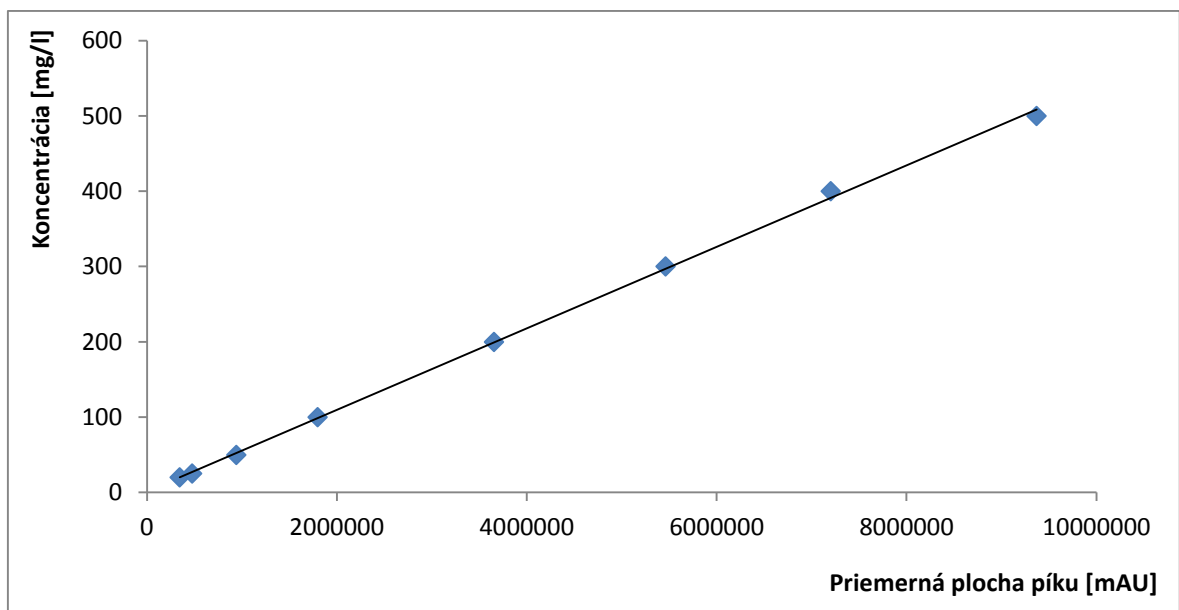


Obr. 25. Kalibrační krivka pre rutín (metóda I)

Kalibrační závislost' pre hesperidín

Tab. 21. Parametre lineárnej regresie pre hesperidín

Koncentrácia [mg/l]	Priemerná plocha píku [AU]	Štatistické parameter pre regresiu: $y = kx + q$		
20	344 081	Počet bodov	$n = 8$	Odhad chyby
25	475 436	Smernica	$k = 18\,471,30$	$\pm 204,67$
50	943 597	Abs. člen	$q = -25\,818,30$	$\pm 53\,836,13$
100	1 798 246	Korelačný koef.	$r = 0,9993$	
200	3 655 339	Reziduálna odch.	$s = 99\,326$	
300	5 463 366			
400	7 202 586			
500	9 372 522			

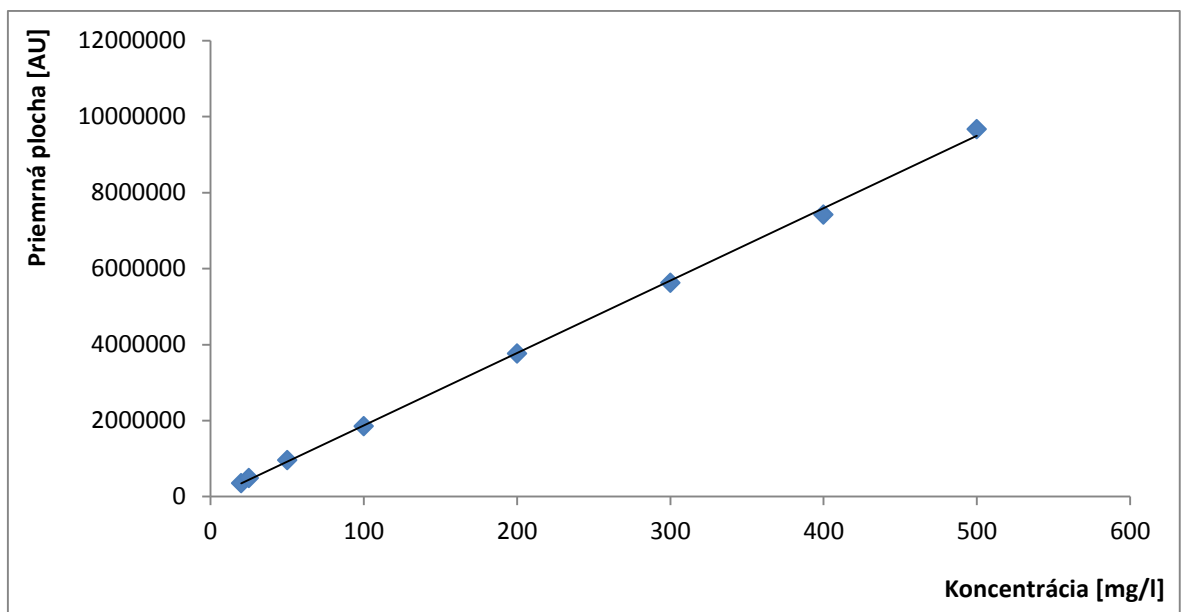


Obr. 26. Kalibrační krivka pre hesperidín (metóda I)

Kalibrační závislost' pre naringín

Tab. 22. Parametre lineárnej regresie pre naringín

Koncentrácia [mg/l]	Priemrná plocha píku [AU]	Štatistické parameter pre regresiu: $y = kx + q$		
20	355 986	Počet bodov	$n = 8$	Odhad chyby
25	490 450	Smernica	$k = 1\,9058,01$	$\pm 217,97$
50	965 742	Abs. člen	$q = -29\,862,91$	$\pm 57\,335,38$
100	1 852 496	Korelačný koef.	$r = 0,9992$	
200	3 766 618	Reziduálna odch.	$s = 105\,782$	
300	5 630 694			
400	7 423 154			
500	9 673 490			

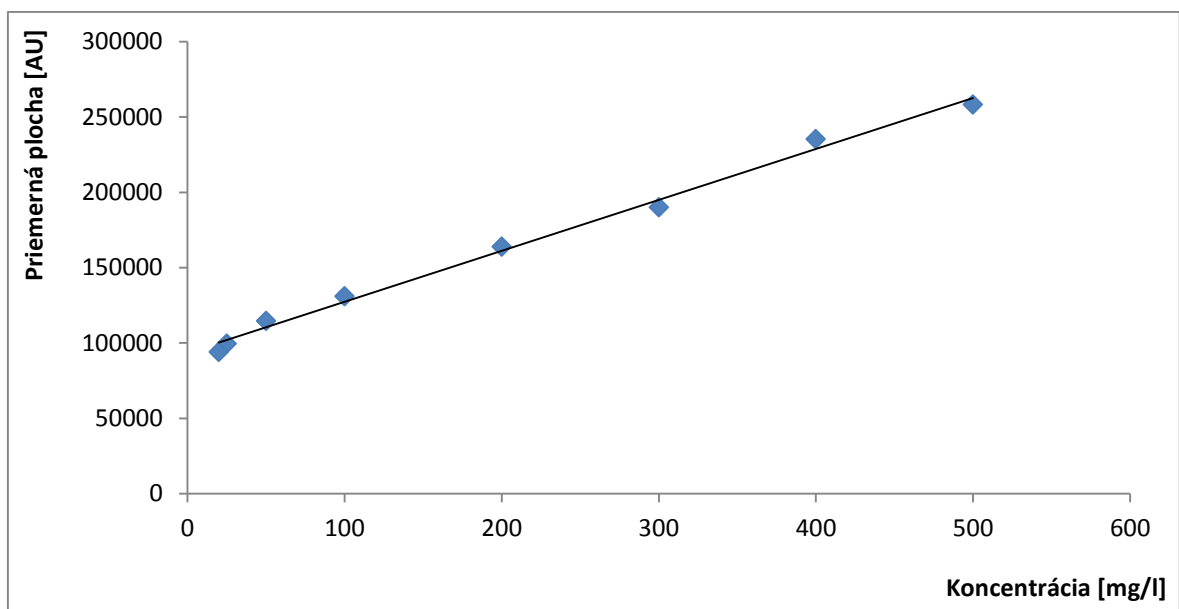


Obr. 27. Kalibrační krivka pre naringín (metóda I)

Kalibračná závislosť pre dihydrokumarín

Tab. 23. Parametre lineárnej regresie pre dihydrokumarín

Koncentrácia [mg/l]	Priemerná plocha píku [AU]	Štatistické parameter pre regresiu: $y = kx + q$		
20	94 103	Počet bodov	$n = 8$	Odhad chyby
25	99 709	Smernica	$k = 338,28$	$\pm 10,99$
50	114 640	Abs. člen	$q = 93 468,24$	$\pm 2889,55$
100	131 167	Korelačný koef.	$r = 0,9940$	
200	163 949	Reziduálna odch.	$s = 5331$	
300	190 051			
400	235 416			
500	258 263			

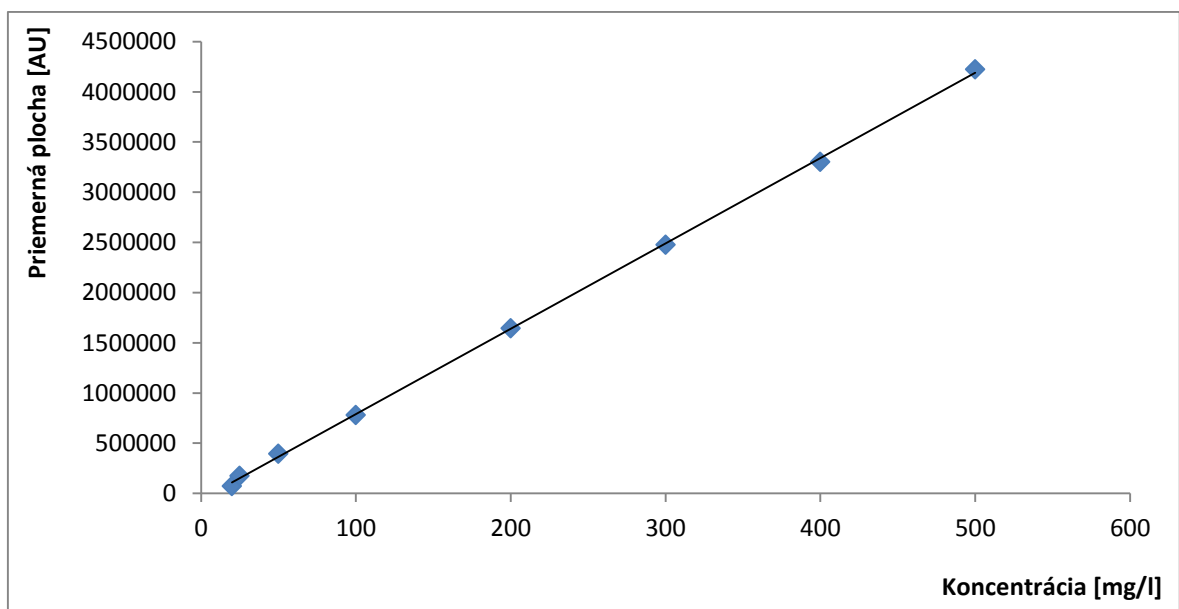


Obr. 28. Kalibračná krivka pre dihydrokumarín (metóda I)

Kalibrační závislost' pre eskulín

Tab. 24. Parametre lineárnej regresie pre eskulín

Koncentrácia [mg/l]	Priemerná plocha píku [AU]	Štatistické parameter pre regresiu: $y = kx + q$		
20	74 163	Počet bodov	$n = 8$	Odhad chyby
25	175 783	Smernica	$k = 8\,500,15$	$\pm 62,24$
50	396 447	Abs. člen	$q = -59\,475,19$	$\pm 16\,371,78$
100	782 833	Korelačný koef.	$r = 0,9997$	
200	1 647 375	Reziduálna odch.	$s = 30\,205$	
300	2 477 611			
400	3 304 226			
500	4 223 504			

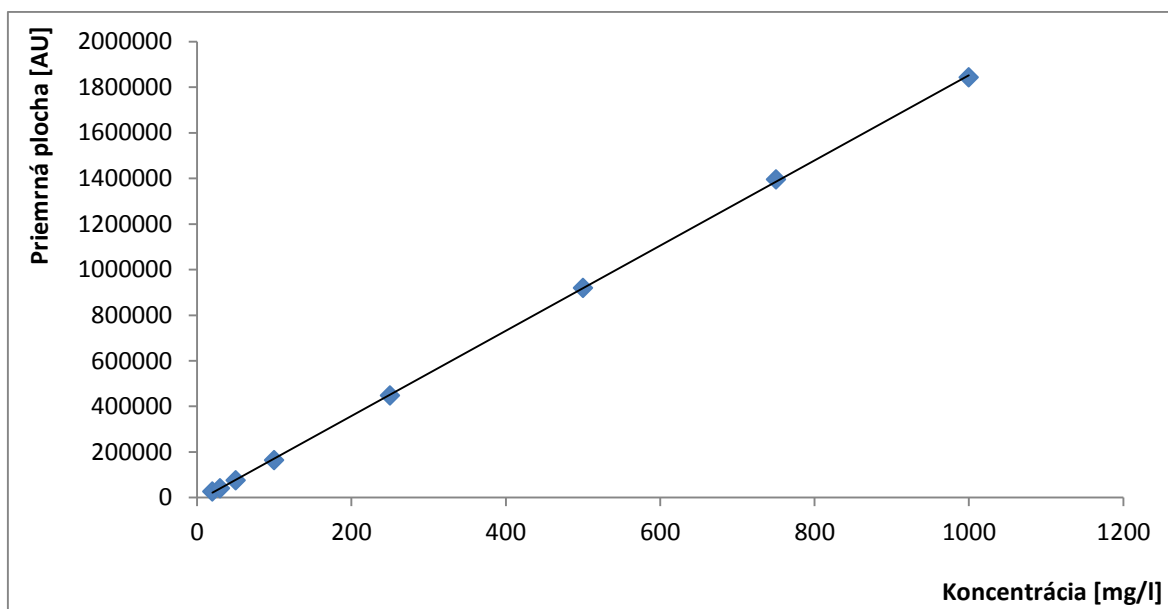


Obr. 29. Kalibrační krivka pre eskulín (metóda I)

Kalibrační závislost' pre escín

Tab. 25. Parametre lineárnej regresie pre escín

Koncentrácia [mg/l]	Priemrná plocha píku [AU]	Štatistické parameter pre regresiu: $y = kx + q$	
20	24 346	Počet bodov	$n = 8$
30	36 325	Smernica	$k = 1\,867,32 \pm 6,90$
50	67 297	Abs. člen	$q = -1\,5285,65 \pm 3\,353,49$
100	142 582	Korelačný koef.	$r = 0,9990$
250	387 190	Reziduálna odch.	$s = 6\,823$
500	795 902		
750	1 208 966		
1000	1 599 078		



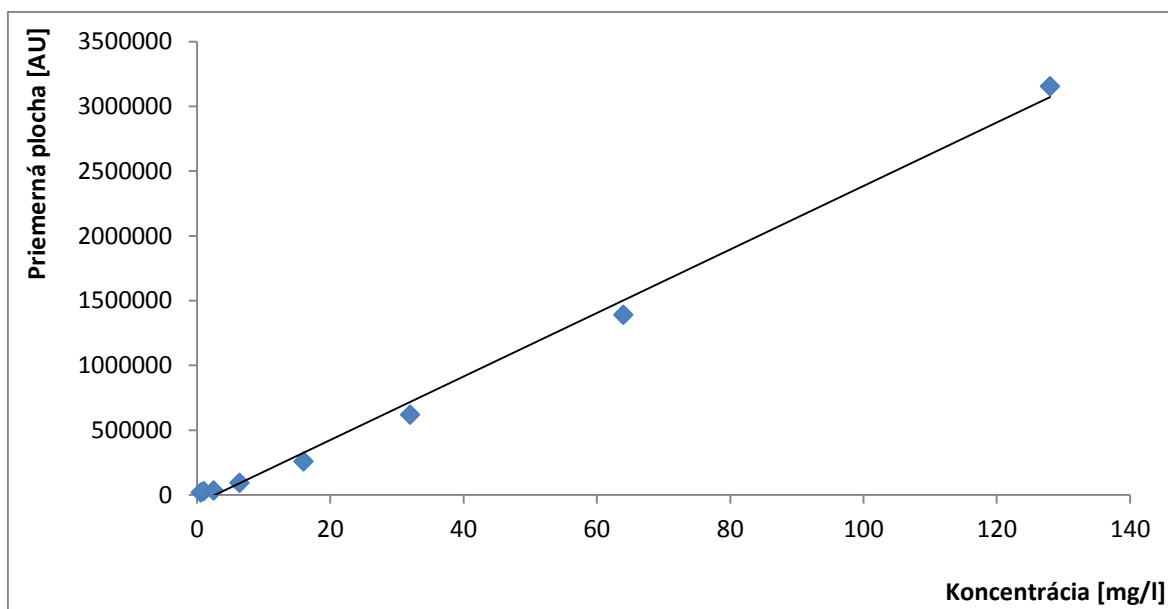
Obr. 30. Kalibrační krivka pre escín (metóda II)

Pre escín bola kalibrační priamka zostrojená za použitia súčtu plôch chromatografických píkov stanovených pre escín a a escín b, ktoré sú prítomné v použitom štandarde.

Kalibračná závislosť pre hypericín

Tab. 26. Parametre lineárnej regresie pre hypericín

Koncentrácia [mg/l]	Priemerná plocha píku [AU]	Štatistické parameter pre regresiu: $y = kx + q$	
20	24 346	Počet bodov	$n = 8$
30	36 325	Smernica	$k = 24\,508,95 \pm 737,88$
50	67 297	Abs. člen	$q = -66\,613,17 \pm 3\,8525,92$
100	142 582	Korelačný koef.	$r = 0,9945$
250	387 190	Reziduálna odch.	$s = 87\,197$
500	795 902		
750	1 208 966		
1000	1 599 078		



Obr. 31. Kalibračná krivka pre hypericín (metóda III)

Linearita, teda závislosť medzi analytickým signálom a koncentraciou bola hodnotená pomocou korelačného koeficientu, ktorý je charakterizovaný ako tesnosť vzájomnej závislosti týchto dvoch premenných. Ako je vidieť z korelačných koeficientov v Tab. 20 až 26, koeficienty ležia v intervale 0,9945 až 0,9997, pričom najlepšia linearita bola stanovená pre eskulín ($r = 0,9997$). Najnižší korelačný koeficient bol naopak stanovený pre hypericín ($r = 0,9945$).

7.7.2 Opakovateľnosť

Pre opakovateľnosť boli použité roztoky jednotlivých extraktov. Ich príprava je popísaná v kapitole 6.3.2. Podľa predpokladaného obsahu bioaktívnych látok boli analyzované vyvinutými metódami. Z plôch vybraných píkov potom boli vypočítané smerodajné odchýlky stanovenia.

Tab. 27. Opakovateľnosť pre metódu I

Extrakt	Pohánka	Ľubovník	Grep	
Plocha [AU]	Rutín	Rutín	Naringín	Hesperidín
	7 950 945	2 959 324	16 243 034	4 748 947
	7 915 904	2 931 530	16 266 214	4 752 092
	7 939 716	2 939 837	16 269 796	4 749 123
	7 980 626	2 939 539	16 246 385	4 747 122
	7 987 832	2 948 666	16 253 631	4 749 348
	7 990 943	2 946 026	16 269 958	4 748 686
Priemer	7 960 994	2 944 153	16 258 169	4 749 219
SD	3 0296	9 521	12 062	1 614
RSD (%)	0,38	0,32	0,07	0,03

Tab. 28. Opakovateľnosť pre metódu II

Extrakt	Pohánka	Ľubovník	Komunica	Gaštan
Plocha [AU]	Escín	Escín	Escín	Escín
	82 642	121 266	49 864	20 300 417
	82 596	120 624	49 217	20 412 129
	82 124	119 754	50 555	20 497 308
	91 326	120 557	49 457	20 438 737
	83 256	119 401	49 540	20 467 621
	82 369	119 159	50 153	20 497 190
Priemer	82 385	120 126	49 797	20 435 567
SD	941	816	494	74 110
RSD (%)	0,78	0,68	0,99	0,36

Relatívna smerodajná odchýlka (RSD (%)) sa pohybovala v rozmedzí 0,03 % až 0,99 %. Najnižšia bola u hesperidínu v glycerínovom extrakte grepu a najvyššia u liehového extraktu komunice. RSD dosahovala hodnoty ≤ 1 %.

7.7.3 Presnosť

Pre hodnotenie presnosti bola použitá metóda štandardného prídavku. Pri pokuse použiť metódu vnútorného štandardu sa pri prídavku rôznych, literatúrou odporúčaných vnútorných štandardov, zhoršila separovateľnosť analytov. Ako vnútorné štandardy sa testovali: metylparabén, etylparabén, propylparabén, butylparabén a benzyl 4-hydroxy benzoát. Pri metóde štandardného prídavku sa analýzou získali plochy pík biologicky aktívnych látok bez a so štandardným prídavkom. Pomocou plôch sa následne spočítala koncentrácia týchto látok podľa vzorca:

$$c_i = \frac{A_i}{A_{IS} - A_i} \times \frac{V_{IS}}{V_i} \times c_{IS} \quad (11)$$

kde:

c_i , A_i a V_i je koncentrácia, plocha a objem neznámeho vzorku

c_{IS} , A_{IS} a V_{IS} je koncentrácia, plocha a objem štandardného prídavku

Pre metódu III, teda stanovenie hypericínu sa nerobila skúška presnosti a správnosti z dôvodu nedostatku štandardu.

Tab. 29. Presnosť metódy I

Extrakt	Pohánka	Ľubovník	Grep	
Koncentrácia [mg/l]	Rutín	Rutín	Naringín	Hesperidín
	2 293	209	8334	1 491
	2 175	198	8809	1 519
	2 322	207	8143	1 405
Priemer	2 263	205	8429	1 472
SD	78	6	342	59
RSD (%)	3,45	2,69	4,06	4,03

Tab. 30. Presnosť pre metódu II

Extrakt	Pohánka	Ľubovník	Komunica	Gaštan
Koncentrácia [mg/l]	Escín	Escín	Escín	Escín
	19	39	54	8 911
	20	37	55	8 904
	18	41	54	8 705
Priemer	19	39	54	8 840
SD	0,7	2	0,36	117
RSD (%)	3,70	4,20	0,65	1,32

Relatívne smerodajné odchýlky pre analyty v študovaných extraktcoch boli v rozmedzí 0,65 % až 4,2 %. Najmenšiu reziduálnu odchýlku mala komunica a najvyššiu ľubovník. RSD vo všetkých prípadoch nadobúdala hodnoty ≤ 5 %.

7.7.4 Správnosť

Pre hodnotenie správnosti bola použitá metóda štandardného prídavku. Výpočet výt'ažnosti sa robil podľa vzorca:

$$c_i = \frac{c_{vz}}{c_{Ref}} \times 100 \quad (12)$$

kde: c_{vz} je koncentrácia vzorku vypočítaná našou metódou

c_{Ref} je koncentrácia referenčnej vzorky

Tab. 31. Správnosť metódy I

Extrakt	Pohánka	Ľubovník	Grep	
Hodnoty	Rutín	Rutín	Naringín	Hesperidín
výt'ažnosti [%]	99,64	102,4	97,05	95,77
	100,32	97,39	100,04	100,04
	100,08	100,83	95,21	96,76
Priemer	100,01	100,19	97,43	97,52
SD	0,35	2,55	2,43	2,24
RSD (%)	0,35	2,55	2,5	2,29

Tab. 32. Správnosť metódy II

Extrakt	Pohánka	Ľubovník	Komunica	Gaštan
Hodnoty	Escín	Escín	Escín	Escín
výt'ažnosti [%]	92,27	97,12	100,01	99,86
	99,85	99,49	100,44	101,78
	98,19	103,53	99,81	101,49
Priemer	96,77	99,95	100,08	101,04
SD	3,98	3,27	0,32	1,03
RSD (%)	4,12	3,27	0,32	1,02

Priemrná hodnota výt'ažnosti je od 96 % až 101 %. Najnižšia je u extraktu pohánky analyzovanej metódou II a najvyššia je u gaštanu taktiež pri analýze metódou II. RSD je ≤ 5 %.

8 KVANTIFIKÁCIA

Vo vybraných rastlinných extraktoch sa kvantifikovali bioaktívne látky podľa zadania. Zadávatelom bola firma Nobilis Tilia s.r.o. Zadanie možno vidieť v Tab. 32. Kvantifikácia zisťovaných bioaktívnych látok sa robila pomocou metódy kalibračnej krivky a z nej vyplývajúcej rovnice vid'. kapitola 7.7.1.

Tab. 33. Stanovované bioaktívne látky v rastlinných extraktoch (zadanie firmy Nobilis Tilia s.r.o.)

Surovina	Typ extraktu	Stanovované látky
ľubovník	liehový	rutín, escín, eskulín, hypericín
ľubovník	olejový <i>po dlhodobom skladovaní</i>	rutín, escín, eskulín, hypericín
ľubovník	olejový <i>čerstvý</i>	rutín, escín, eskulín, hypericín
pohánka	liehový	rutín, escín, eskulín
komunica	liehový	rutín, escín, eskulín, dihydrokumarín
gaštan	liehový	rutín, escín, eskulín
grep	glycerínový	naringín, hesperidín

Po počiatočných analýzach metódou I sa zistilo, že zo zadaných látok, ktoré sú touto metódou stanoviteľné sa nachádza v extraktoch iba rutín, naringín a hesperidín. Rutín v liehovom extrakte ľubovníku a pohánky, a hesperidín a naringín v glycerínovom extrakte grepu vid'. Tab. 33. Metódou II sa zistila prítomnosť escínu v týchto liehových extraktoch: gaštan, komunika, ľubovník a pohánka vid'. Tab. 34. Metódou III sa zistila prítomnosť hypericínu vo všetkých extraktoch ľubovníka. Na rozdiel od predpokladu zadávateľa neboli v extraktoch nájdené nasledujúce látky: eskulín v liehovom extrakte pohánky a gaštanu a v liehovom a olejovom extrakte ľubovníka, rutín a escín v olejovom extrakte ľubovníka. V liehovom extrakte komunice bol zistený zo všetkých predpokladaných látok rutínu, escínu, eskulínu a dihydrokumarínu len escín. V grepe boli nájdené všetky predpokladané látky. Najprekvapivejším bola neprítomnosť eskulínu v liehovom extrakte gaštanu, ktorého prítomnosť sa v literatúre uvádza. Eskulín sa podľa nej má nachádzať v obale plodu gaštanu. Na základe jeho neprítomnosti teda môžeme predpokladať že extrakt gaštanu sa vyrábala iba z plodu gaštanu, bez obalu.

Tab. 34. Množstvo bioaktívnych látok v jednotlivých rastlinných extraktoch analyzovaných metódou I

Extrakty	Pohánka	Ľubovník	Grep	
	rutín	rutín	naringín	hesperidín
Priemerná koncentrácia [mg/l]	2 033	247	5 636	1 448
SD	17	23	369	16
RSD (%)	0,84	9,3	6,6	1,1

Tab. 35. Množstvo bioaktívnych látok v jednotlivých rastlinných extraktoch analyzovaných metódou II

Extrakty	Pohánka	Ľubovník	Komunica	Gaštan
	escín	escín	escín	escín
Priemerná koncentrácia [mg/l]	32,9	50,8	48,4	8 417
SD	0,1	3,8	0,3	79
RSD (%)	0,3	7,5	0,62	0,94

Tab. 36. Množstvo bioaktívnych látok v jednotlivých rastlinných extraktoch analyzovaných metódou III

Extrakty	Ľubovník	Ľubovník	Ľubovník
	hypericín liehový	hypericín olejový (čerstvý)	hypericín olejový (skladovaný)
Priemerná koncentrácia [mg/l]	0,27	0,1	0,1
SD	0,03	-	-
RSD (%)	11,1	-	-

Pre RSD boli dosiahnuté hodnoty od 0,3 % až 9,3 %. Najnižšiu relatívnu odchýlku mala pohánka stanovovaná metódou II, RSD = 0,31 %, naopak najvyššiu mal ľubovník stanovovaná metódou I a to 9,3 %. RSD by sa mala nadobúdať hodnoty do 5 %. Túto hraniciu prekračujú extrakty, ktoré boli stanovované metódou I, konkrétne ľubovník pri stanovovaní rutí-

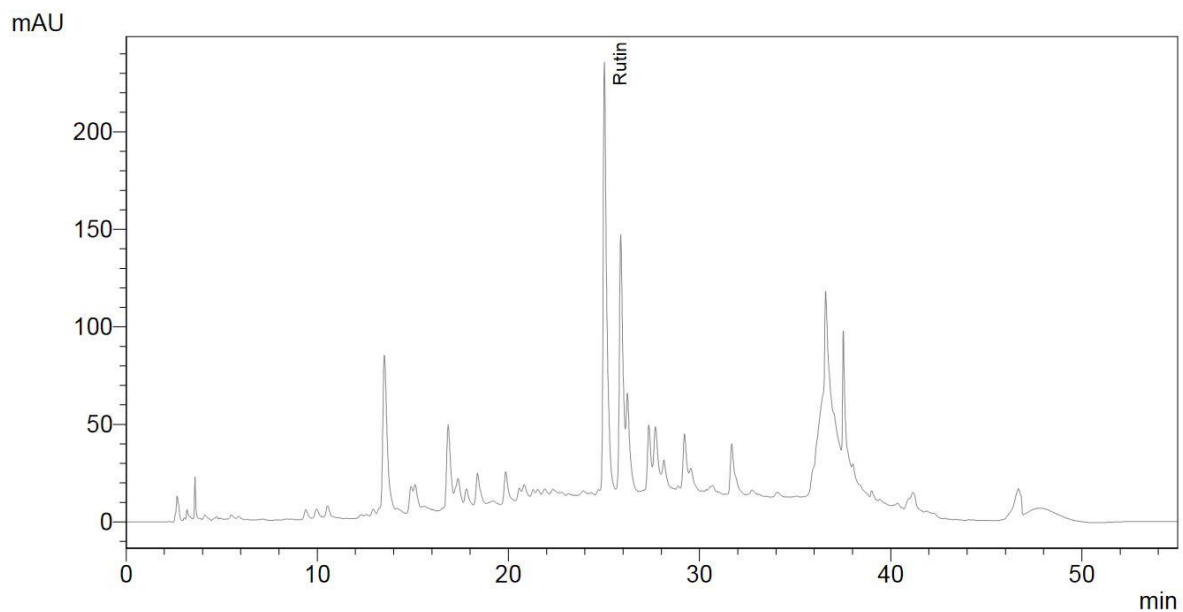
nu a grep pri stanovovaní marignínu. Ale tiež extrakt ľubovníka stanovaný metódou II, a to pri stanovení escínu.

Obsah rutínu v extrakte pohánky sa stanovil na $(2\,033 \pm 17)$ mg/l a v extrakte ľubovníku na (247 ± 23) mg/l. Naproti metóde štandardného prídavku v prídape extraktu pohánky bola koncentrácia výrazne nižšia, rozdiel činil 230 mg/l. Pri extrakte ľubovníka bola koncentrácia vyššia a to o 42 mg/l. Množstvo naringínu a hesperidínu v extrakte grepu činilo $(5\,636 \pm 369)$ mg/l a $(1\,448 \pm 16)$ mg/l. Metódou štandardného prídavku bola zistené množstvo v prípade naringínu vyššie až o 2 793 mg/l, v prípade hesperidínu o 24 mg/l.

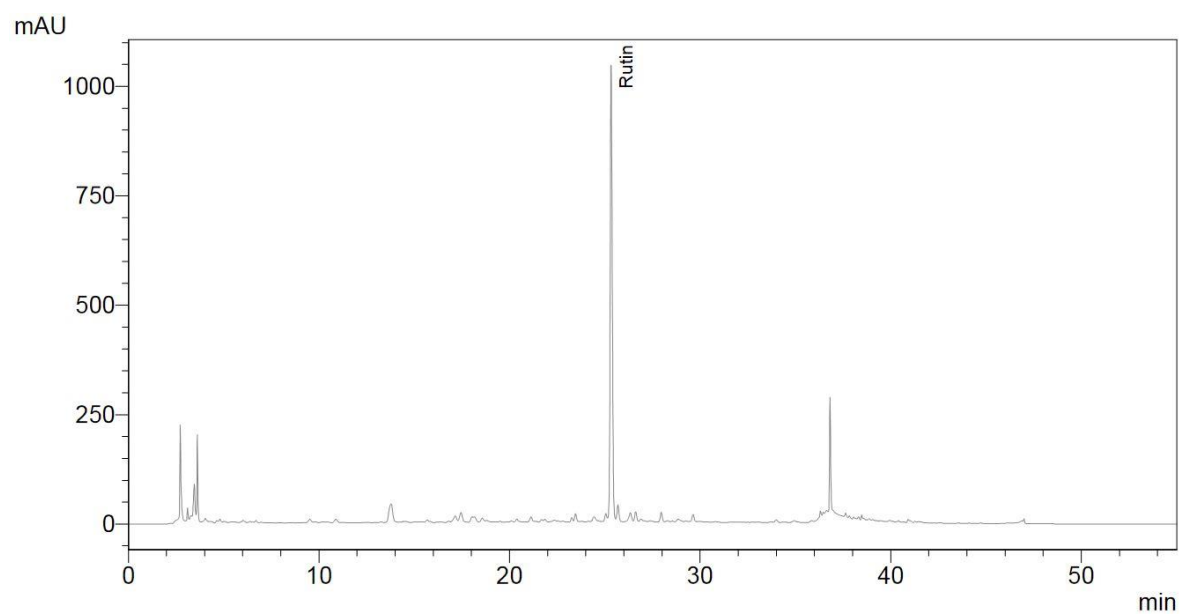
Koncentrácia escínu stanovovaného metódou II v extrakte gaštanu bola stanovená na $(8\,417 \pm 79)$ mg/l. V extrakte komuniči bolo stanovených $(48,4 \pm 0,3)$ mg/l escínu, v extrakte ľubovníku $(50,8 \pm 3,8)$ mg/l a v extrakte pohánky $(32,9 \pm 0,1)$ mg/l. Tieto hodnoty sa praveľmi nelíšia od koncentrácií stanovených metódou štandardného prídavku. Výrazný rozdiel je len pri stanovení escínu v extrakte gaštanu, ktorý je oproti štandardnému prídavku nižší o 428 mg/l. Ostatné rozdiely v množstve escínu v extraktach sú v vyššie alebo nižšie o 10 až 20 mg/l.

Metódou III sa zistila koncentrácia hypericínu v liehovom a olejovom extrakte ľubovníku. V liehovom extrakte bola koncentrácia $(0,27 \pm 0,03)$ mg/l. V olejových extraktoch čerstvom aj dlhodobo skladovanom bola zistená koncentrácia 0,1 mg na 1000 g oleja s ohľadom na postup extraktcie uvedený v kapitole 6.3.3. Koncentrácia hypericínu je okrem toho na hranici medze stanoviteľnosti použitej metódy. Koncentrácia hypericínu sa nezisťovala žiadnou inou metódou.

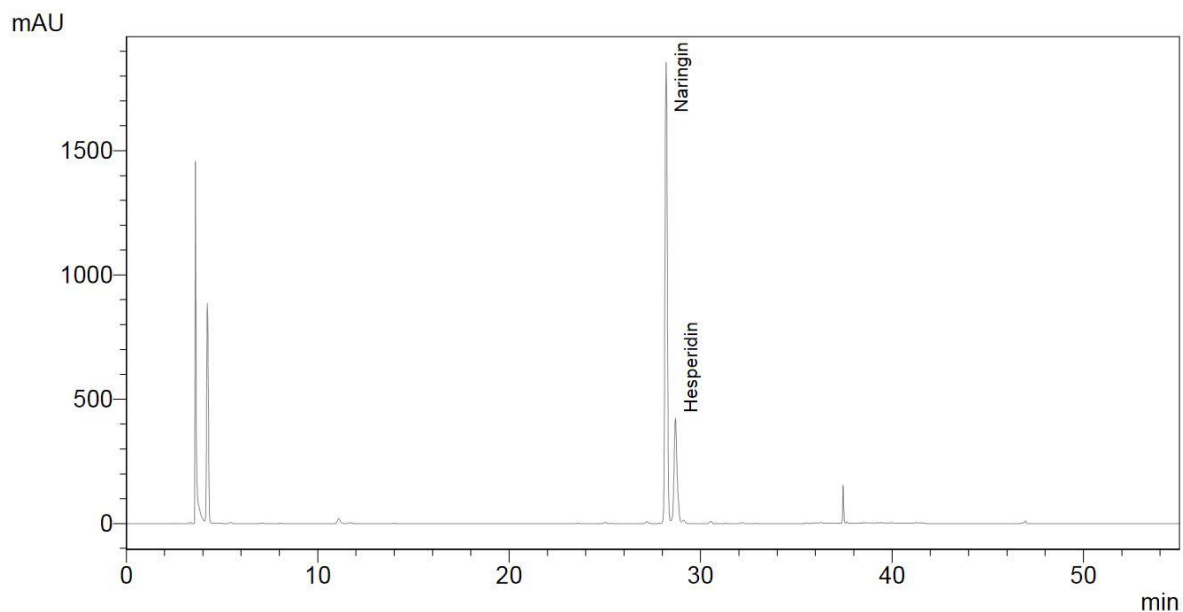
Rozdieli medzi koncentraciami stanovenými pomocou metódy kalibračnej krivky a metódou štandardného prídavku môžu byť spôsobené tým, že roztoky extraktov pri metóde štandardného prídavku boli z inej dodávky extraktov. Rozdiely mohli byť spôsobené aj chybami ktorých sa nevedome dopustil pracovník pri vážení jednotlivých prídavkov alebo návažiek pre prípravu kalibračných roztokov. Tiež mohla nastať chyba pri riedení roztokov vzoriek jednotlivých extraktov. Prístroj tiež vykazoval určitú pohyblivosť tlaku pri jednotlivých meraniach a teda mohlo dôjsť k výchyľkám prietoku na kolónu. To by však nemalo kvantifikáciu ovplyvniť.



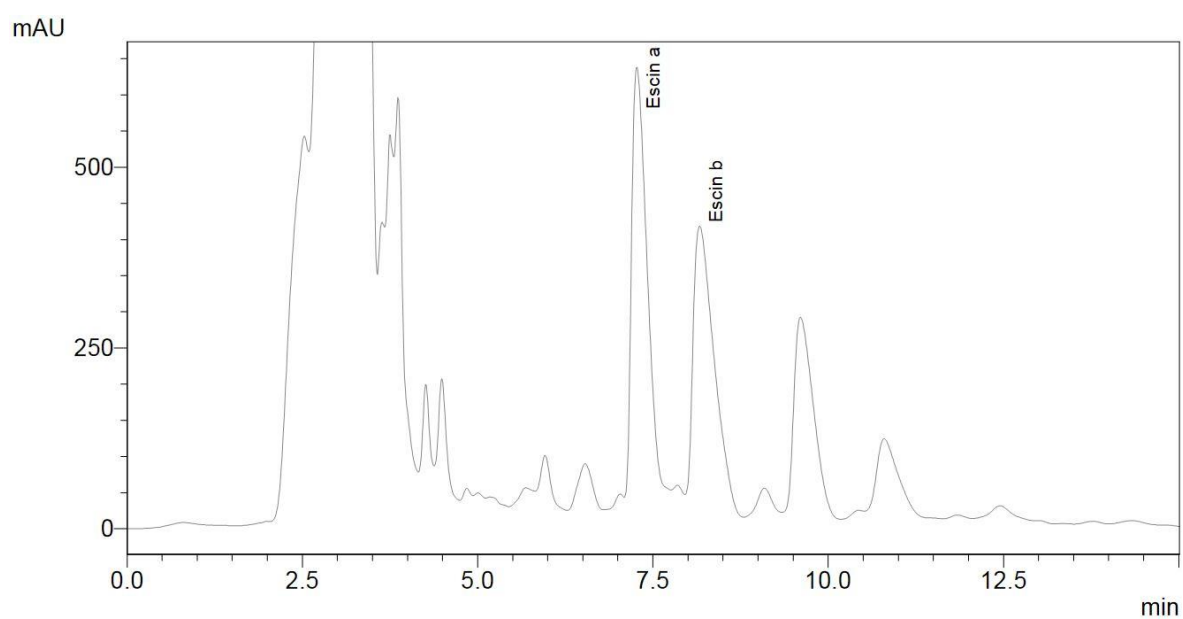
Obr. 32. Chromatogram extraktu ľubovníka analyzovaného metódou I



Obr. 33. Chromatogram extraktu pohánky analyzovanej metódou I



Obr. 34. Chromatogram extraktu grepu analyzovaného metódou I



Obr. 35. Chromatogram gaštanu analyzovaného metódou II

ZÁVER

Pre stanovenie vybraných bioaktívnych látok v rastliných extraktoch poskytnutých firmou Nobilis Tilia s.r.o boli vyvinuté tri HPLC metódy. Boli analyzované nasledujúce extrakty: liehový extrakt pohánky, komunice, gaštanu a ľubovníka, olejový extrakt ľubovníka a glycerínový extrakt grepu. HPLC metódy boli nasledovné: metóda I s gradientom pre stanovenie rutínu, hesperidínu, naringínu, dihydrokumarínu a eskulínu. Metóda II ktorá je izokratická pre stanovenie escínu a metóda III pre stanovenie hypericínu, taktiež izokratická. Výsledné chromatografické podmienky sú nasledovné: pri všetkých troch metódach bola použitá kolóna XSelect® CSH™ C18 5 µm (4,6 x 250 mm), pričom jej teplota sa udržiavala na 40 °C. Prietok mobilnej fázy bol 0,8 ml/l. Ako zložky mobilnej fázy boli použité A = 0,5% vodný roztok kyseliny octovej, B = acetonitril, C = metanol a D = 10 mM amónium acetátu. Pre dektciu bol použitý detektor DAD.

Metódou I sa stanovovali rutín, hesperidín, naringín, dihydrokumarín a eskulín. Vlnová dĺžka bola nastavená na 190 až 370 nm. Ako mobilná fáza slúžil 0,5% vodný roztok kyseliny octovej a acetonitril v gradiente, ktorý je uvedený v Tab. 13. Izokratickou metódou II sa stanovoval escín a to pri vlnovej dĺžke 203 nm. Mobilná fáza bola tvorená: acetonitri- lom 27 %, metanolom 27 % a amónium acetátom 46 %. Metóda III, taktiež izokratická bola vyvinutá pre stanovenie hypericínu. Stanovoval sa pri 590 nm a mobilná fáza sa skladala z acetonitrilu 54 %, metanolu 36 % a amónium acetátu 10 %.

Pri testovaní chromatografického systému bola účinnosť kolóny vyjadrená počtom chromatografických poschodí. Všetky látky splnili podmienku že počet teoretických poschodí bol vyšší ako 1 500. Počet teoretických poschodí sa pohyboval v rozmedzí 182 221 až 4 613. Látky analyzované vyvinutými metódami boli ďalej charakterizované asymetriou ich pík. Píky splňovali podmienky, že hodnota asymetrie bola pod hodnotu 2. Hypericín jediný prekročil túto hodnotu (A_s hypericínu=2,23) čo poukazuje na mierne chvostovanie. Rozlišovanie pík sa počítalo iba pre píky naringínu a hesperidínu, ktoré sa eluovali blízko seba. Hodnota rozlíšenia je 2,48. Hodnota je vyššia ako 1,5 čo poukazuje na dobré rozlíšenie.

Pri testovaní linearity zo závislosti medzi plochou a koncentráciou štandardu nadobúdali korelačné koeficienty hodnoty 0,9997 pri eskulíne až 0,9945 pri hypericíne. Pri opakova- telnosti boli pre všetky metódy stanovené reziduálne odchýlky ≤ 1 %. Ich hodnoty boli od 0,03 % až 0,99 %. Presnosť a správnosť sa určila metódou štandardného prídavku. Rela-

tívna odchýlka presnosti pre všetky metódy bola pod hodnotou 5 %. Pri metóde I (rutín, naringín, hesperidín, esculín) bola v rozmedzí 2,69 % až 4,06 % a pre metódu II (escín) v rozmedzí 0,65 % až 4,2 %. Pre metódu III (hypericín) sa presnosť a správnosť metódou štandardného prídavku nerobila z dôvodu nedostatku štandardu. Správnosť sa vyjadřila hodnotou výťažnosti ktorá nadobúdala hodnoty pri metóde I v rozmedzí 97,43 % až 100,19 % a pri metóde II 96,77 % až 101,04 %. Podmienku že výťažnosť má nadobúdať hodnoty 95 % až 101,5 % teda splnili všetky vzorky.

Pri metóde štandardného prídavku sa zistila aj koncentrácia jednotlivých bioaktívnych látok v extraktoch. V liehovom extrakte pohánky sa stanovil rutín o koncentrácií 2 263 mg/l a escín 19 mg/l. Escín sa stanovil v liehových extraktoch gaštanu o koncentrácií 8 840 mg/l, v komunicí o koncentrácií 54 mg/l a v ľubovníku o koncentrácií 39 mg/l. V liehovom extrakte ľubovníka sa tiež stanovil rutín o koncentrácií 205 mg/l. V glycerínovom extrakte grepu sa stanovil naringín o koncentrácií 8 429 mg/l a hesperidín o koncentrácií 1 472 mg/l.

Kvantifikáciou za použitia kalibračnej krivky sa zistili nasledovné koncentrácie bioaktívnych látok. V liehovom extrakte pohánky rutín o koncentrácií 2 033 mg/l. Potom escín v liehových extraktoch gaštanu o koncentrácií 8 417 mg/l, komunicí o koncentrácií 28,4 mg/l a v ľubovníku o koncentrácií 50,8 mg/l. V ľubovníku sa kvantifikoval aj rutín, ktorého koncentrácia nadobudla hodnotu 247 mg/l. V glycerínovom extrakte sa stanovili koncentrácie naringínu o 5 636 mg/l a hesperidínu o 1 448 mg/l.

Rozdieli medzi koncentraciami stanovených metódou štandardného prídavku a pomocou metódou kalibračnej krivky môžu byť spôsobené rozdielmi medzi extraktmi. Kvantifikácia bola robená na roztokoch z inej dodávky extraktov. Chyba ale môže byť spôsobená pracovníkom pri vážení jednotlivých prídavkov alebo pri riedení roztokov vzoriek jednotlivých extraktov. Za výsledné koncentrácie bioaktívnych látok v rastlinných extraktoch by vzhľadom na matematické výpočty relatívnych odchýlok mali byť koncentrácie zistené metódou štandardného prídavku.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATURY

- [1] PATIL, Bhimanagouda S., G. K. JAYAPRAKASHA, K. N. CHIDAMBARA MURTHY a Amit VIKRAM. Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities, and Challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, **57**(18): 8142-8160. DOI: 10.1021/jf9000132. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9000132>
- [2] ESCARPA, A. a M. C. GONZALEZ. An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2001, **31**(2): 57-139. DOI: 10.1080/20014091076695. ISSN 1040-8347. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/20014091076695>
- [3] ANDERSEN, Øyvind M a Kenneth R MARKHAM. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. Boca Raton, FL: CRC, Taylor, 2006, 1237 p. ISBN 08-493-2021-6.
- [4] HARBORNE, Jeffrey B a Christine A WILLIAMS. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000, **55**(6): 481-504. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00235-1. ISSN 00319422. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942200002351>
- [5] FUHRMAN, Biana a Michael AVIRAM. Polyphenols and Flavonoids Protect LDL Against Atherogenic Modifications. *Handbook of Antioxidants*. CRC Press, 2001. DOI: 10.1201/9780203904046.ch16. ISBN 978-0-8247-0547-3. Dostupné také z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203904046.ch16>
- [6] BENDER, David A. *Bender's dictionary of nutrition and food Technology*. 8th ed. Cambridge: Woodhead Pub, 2006. ISBN 978-184-5690-519.
- [7] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin II.* 3. Havlíčkův Brod: OSSIS, 2009, s. 199-205. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [8] BEECHER, Gary R. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *In Journal of Nutrition*. **2003**: 3248-3254
- [9] KLEJDUS, Bořivoj, Dagmar ŠTĚRBOVÁ, Pavel STRATIL a Vlastimil KUBÁŇ. Identifikace a charakterizace isoflavonů v rostlinných extraktech za použití kombinace HPLC s hmoznostním detektorem a detektorem s diodovým polem (HPLC-DAD-MS). *Chemické listy*. **2003**: 530-539.

- [10] POURCEL, L, J ROUTABOUL, V CHEYNIER, L LEPINIEC a I DEBEAUJON. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*. 2007, **12**(1): 29-36. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.11.006. ISSN 13601385. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138506003141>
- [11] POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ TŘÍ ANALYTICKÝCH METOD PRO STANOVENÍ OBSAHU RUTINU V POHANCE TATARSKÉ. *Chemické listy*. 2009, **103**(10): 827-831. ISSN 1213-7103.
- [12] HOSSEINZADEH, Hossein a Marjan NASSIRI-ASL. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2014, **37**(9): 783-788. DOI: 10.1007/s40618-014-0096-3. ISSN 1720-8386. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s40618-014-0096-3>
- [13] Rutin hydrate. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2015-11-09]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r5143?lang=en&ion=CZ>
- [14] KOVAL'SKII, I. V., I. I. KRASNYYUK, I. I. KRASNYYUK, O. I. NIKULINA, A. V. BELYATSKAYA, Yu. Ya. KHARITONOV, N. B. FELDMAN a S. V. LUTSENKO. Mechanisms of Rutin Pharmacological Action (Review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2014, **48**(2): 73-76. DOI: 10.1007/s11094-014-1050-6. ISSN 0091-150x. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11094-014-1050-6>
- [15] FABJAN, Nina, Janko RODE, Iztok Jože KOŠIR, Zhuanhua WANG, Zheng ZHANG a Ivan KREFT. Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a Source of Dietary Rutin and Quercitrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, **51**(22): 6452-6455. DOI: 10.1021/jf034543e. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf034543e>
- [16] SHAO, Huikai, Lingguo ZHAO, Jian CHEN, Haitao ZHOU, Shuting HUANG a Kang LI. Preparation, characterization and application of molecularly imprinted monolithic column for hesperetin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, **111**: 241-247. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.04.006. ISSN 07317085. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708515002344>

- [17] NARDARAJAH, Durgadevi. Hesperidin-A short Review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2014, **7**(1): 78-81.
- [18] Hesperidin. *Exaime* [online]. 2013, 2014-04-04 [cit. 2015-11-08]. Dostupné z: <http://examine.com/supplements/hesperidin/>
- [19] Hesperidin. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2015-11-09]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h5254?lang=en&ion=CZ>
- [20] KANDHARE, Amit D., Pinaki GHOSH a Subhash L. BODHANKAR. Naringin, a flavanone glycoside, promotes angiogenesis and inhibits endothelial apoptosis through modulation of inflammatory and growth factor expression in diabetic foot ulcer in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 2014, **219**: 101-112. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.05.012. ISSN 00092797. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279714001707>
- [21] Naringin. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2015-11-10]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/71162?lang=en>
- [22] KAMAT, D. P., S. G. TILVE, V. P. KAMAT a J. K. KIRTANY. Syntheses and Biological Activities of Chroman-2-ones. A Review. *Organic Preparations and Procedures International*. 2015, **47**(1): 1-79. DOI: 10.1080/00304948.2015.983805. ISSN 0030-4948. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00304948.2015.983805>
- [23] Dihydrocoumarin. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2015-11-10]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d104809?lang=en&ion=CZ&gclid=CNro6-SuhsCFQblwgodUgMJHw>
- [24] GASPARETTO, João C., Thais M. GUIMARÃES DE FRANCISCO, Francinete R. CAMPOS a Roberto PONTAROLO. Development and validation of two methods based on high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining 1,2-benzopyrone, dihydrocoumarin, o-coumaric acid, syringaldehyde and kaurenoic acid in guaco extracts and pharmaceutical pr. *Journal of Separation Science*. 2011, **34**(7), 740-748. DOI: 10.1002/jssc.201000792. ISSN 16159306. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201000792>
- [25] SIRTORI, Cesare R. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacological Research*. 2001, **44**(3): 183-193. DOI:

- 10.1006/phrs.2001.0847. ISSN 10436618. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661801908473>
- [26] Beta-Aescin BP/USP. *Glene Angels: Phyto Sciences (P) Ltd.* [online]. [cit. 2015-11-10]. Dostupné z: http://gleneangels.com/?page_id=39
- [27] *Pitt Quantum Repository* [online]. [cit. 2015-11-04]. Dostupné z: <http://pqr.pitt.edu/mol/XHCADAYNFIFUHF-TVKJYDDYSA-N>
- [28] BHARADWAJ S., ACHYUT, N. SRINIVAS, E. RAJEEV REDDY, R. NAGARAJU, P. GOVERDHAN a E. VENKATESHWARLU. Rapid HPLC Method development and validation of esculin. *Journal of Chemical and Pharmaceutical sciences*. 2011, **4**(3): 119-121. ISSN 0974-2115.
- [29] NAAZ, Farah, M. Z. ABDIN a Saleem JAVED. Protective effect of esculin against prooxidant aflatoxin B1-induced nephrotoxicity in mice. *Mycotoxin Research*. 2014, **30**(1): 25-32. DOI: 10.1007/s12550-013-0185-8. ISSN 0178-7888. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12550-013-0185-8>
- [30] KANG, Ki Sung, Woojung LEE, Yujung JUNG, Ji Hwan LEE, Seungyong LEE, Dae-Woon EOM, Youngsic JEON, Hye Hyun YOO, Ming Ji JIN, et al. Protective Effect of Esculin on Streptozotocin-Induced Diabetic Renal Damage in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, **62**(9): 2069-2076. DOI: 10.1021/jf403840c. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf403840c>
- [31] QADRI, S.M.H., M. I. DESILVA a S. ZUBAIRI. Rapid test for determination of esculin hydrolysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1980, **12**(3): 472-474.
- [32] Esculin hydrate. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2015-11-09]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/02350?lang=en&ion=CZ>
- [33] BIELY, Peter, Mária CZISZÁROVÁ, Ken K. Y. WONG a Alan FERNYHOUGH. Enzymatic acylation of flavonoid glycosides by a carbohydrate esterase of family 16. *Biotechnology Letters*. 2014, **36**(11): 2249-2255. DOI: 10.1007/s10529-014-1599-x. ISSN 0141-5492. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-014-1599-x>
- [34] MATYSIK, G., K. GLOWNIAK, E. SOCZEWIŃSKI a M. GARBACKA. Chromatography of esculin from stems and bark of *Aesculus hippocastanum* L. for consecutive vegetative periods. *Chromatographia*. 1994, **38**(11-12): 766-770. DOI:

- 10.1007/BF02269634. ISSN 0009-5893. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02269634>
- [35] KUBIN, A., F. WIERRANI, U. BURNER, G. ALTH a W. GRÜNBERGER. Hypericin - The Facts About a Controversial Agent. *Current Pharmaceutical Design*. Bentham Science Publishers Ltd., 2005, **11**(2): 233-253.
- [36] FREEMAN, Dalia, Leonid KONSTANTINOVSKII a Yehuda MAZUR. The Structure of Hypericin in Solution. Searching for Hypericin's 1,6 Tautomer¶. *Photochemistry and Photobiology*. 2001, **74**(2): 206-210. ISSN 00318655. Dostupné také z: [http://doi.wiley.com/10.1562/0031-8655\(2001\)0740206TSOHIS2.0.CO2](http://doi.wiley.com/10.1562/0031-8655(2001)0740206TSOHIS2.0.CO2)
- [37] Hypericin. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2015-12-04]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/00190180?lang=en>
- [38] PIETTA, Piergiorgio, Claudio GARDANA a Annamaria PIETTA. *Flavonoids in Health and Disease*. 2. CRC Press, 2003, s. 43-71. ISBN 978-1-4398-5811-0.
- [39] ULBRICHT, Catherine, Natasha TIFFANY, Heather BOON, Catherine ULBRICHT, Ethan BASCH, Steve BENT, E. P. BARRETTE, Michael SMITH, David SOLLARS, et al. Horse Chestnut. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*. The Haworth Press, 2002, **2**(1): 71-85. DOI: 10.1080/J157v02n01_10. ISSN 1522-8940. Dostupné také z: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/J157v02n01_10
- [40] OSZMIAŃSKI, Jan, Stanisław KALISZ a Wojdyło ANETA. The Content of Phenolic Compounds in Leaf Tissues of White (*Aesculus hippocastanum* L.) and Red Horse Chestnut (*Aesculus carea* H.) Colonized by the Horse Chestnut Leaf Miner (*Cameraria ohridella* Deschka. *Molecules*. 2014, **19**(9): 14625-14636. DOI: 10.3390/molecules190914625. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/14625/>
- [41] AESCULUS HIPPOCASTANUM L. – jírovec maďal / pagaštan kon-ský. *BOTANY* [online]. 2007-07-05 [cit. 2015-11-13]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/aesculus-hippocastanum/>
- [42] VOGRINČIČ, Maja, Maria TIMORACKA, Silvia MELICHACOVA, Alena VOLLMANNOVA a Ivan KREFT. Degradation of Rutin and Polyphenols during the Preparation of Tartary Buckwheat Bread. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry*. 2010, **58**(8): 4883-4887. DOI: 10.1021/jf9045733. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9045733>
- [43] FAGOPYRUM ESCULENTUM Moench – pohanka obecná / pohánka jedlá. *BOTANY* [online]. 2008-09-12 [cit. 2015-11-13]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/fagopyrum-esculentum/>
- [44] MORISHITA, Toshikazu, Hiroyasu YAMAGUCHI a Konosuke DEGI. The Contribution of Polyphenols to Antioxidative Activity in Common Buckwheat and Tartary Buckwheat Grain. *Plant Production Science*. 2007, **10**(1): 99-104. DOI: 10.1626/pps.10.99. ISSN 1343-943x. Dostupné také z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/pps/10.99?from=CrossRef>
- [45] KOVALEVA, A. M., I. V. GRUD'KO, A. N. ALEKSANDROV a A. N. KOMISSARENKO. GC/MS study of the chloroform fraction of Melilotus officinalis. *Chemistry of Natural Compounds*. 2009, **45**(4): 585-586.
- [46] CHOREPSIMA, Stamatia, Konstantinos TENTOLOURIS, Dimitrios DIMITROULIS a Nikolaos TENTOLOURIS. Melilotus: Contribution to wound healing in the diabetic foot. *Journal of Herbal Medicine*. 2013, **3**(3): 81-86. DOI: 10.1016/j.hermed.2013.04.005. ISSN 22108033. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210803313000444>
- [47] MARTINEZ-PASTOR, Barbara a Raul MOSTOSLAVSKY. Sirtuins, Metabolism, and Cancer. *Frontiers in Pharmacology*. 2012, **3**(22): 26-32. DOI: 10.3389/fphar.2012.00022. ISSN 1663-9812. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2012.00022/abstract>
- [48] Gene Family: Sirtuins (SIRT). *HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee* [online]. [cit. 2015-11-25]. Dostupné z: <http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/938>
- [49] SIRT1 sirtuin 1 [Homo sapiens (human)]. *NCBI: Gene* [online]. 2015-11-22 [cit. 2015-11-26]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene>
- [50] BOURDON, Jean-Christophe, Sylvanie SURGET a Marie P. KHOURY. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *OncoTargets and Therapy*. 2013, : 57-68. DOI: 10.2147/OTT.S53876. ISSN 1178-6930. Dostupné také z: <http://www.dovepress.com/uncovering-the-role-of-p53-splice-variants-in-human-malignancy-a-clini-peer-reviewed-article-OTT>

- [51] LAWVERE, SILVANA a MARTIN C. MAHONEY. St. John's Wort. *American Family Physician*. 2005, **72**(11): 2249-2254.
- [52] COUCEIRO, M.A., F. AFREEN, S.M.A. ZOBAYED a T. KOZAI. Variation in concentrations of major bioactive compounds of St. John's wort: Effects of harvesting time, temperature and germplasm. *Plant Science*. 2006, **170**(1): 128-134. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.08.011. ISSN 01689452. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945205003006>
- [53] HYPERICUM PERFORATUM L. – třezalka tečkovaná / ľubovník bodkovaný. *BOTANY* [online]. 2007-07-06 [cit. 2015-11-14]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/hypericum-perforatum/>
- [54] MAZI-KOTWAL, Nadeem a Madhavan SESHADRI. Drug Interactions with Grapefruit Juice. *British Journal of Medical Practitioners*. 2012, **5**(4): 31-33.
- [55] DE CASTRO, Whocely Victor, Susanne MERTENS-TALCOTT, Anke RUBNER, Veronika BUTTERWECK a Hartmut DERENDORF. Variation of Flavonoids and Furanocoumarins in Grapefruit Juices: A Potential Source of Variability in Grapefruit Juice–Drug Interaction Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, **54**(1): 249-255. DOI: 10.1021/jf0516944. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0516944>
- [56] CHEN, Jingfu, Runmin GUO, Hai YAN, Lihong TIAN, Qiong YOU, Shanghai LI, Ruina HUANG a Keng WU. *Basic*. 2014, **114**(4). DOI: 10.1111/bcpt.12153. ISSN 17427835. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/bcpt.12153>
- [57] IKEMURA, Miyako, Yasuto SASAKI, John C. GIDDINGS a Junichiro YAMAMOTO. Preventive Effects of Hesperidin, Glucosyl Hesperidin and Naringin on Hypertension and Cerebral Thrombosis in Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Phytotherapy Research*. 2012, **26**(9): 1272-1277. DOI: 10.1002/ptr.3724. ISSN 0951418x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.3724>
- [58] SOUZA, Leandro C., Marcelo G. DE GOMES, André T.R. GOES, Lucian DEL FABBRO, Carlos B. FILHO, Silvana P. BOEIRA a Cristiano R. JESSE. Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect caused by hesperidin in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2013, **40**: 103-109. DOI:

- 10.1016/j.pnpbp.2012.09.003. ISSN 02785846. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278584612002412>
- [59] MAHMOUD, Ayman M. Hesperidin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by upregulation of PPAR γ and abrogation of oxidative stress and inflammation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2014, **92**(9): 717-724. DOI: 10.1139/cjpp-2014-0204. ISSN 0008-4212. Dostupné také z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/cjpp-2014-0204>
- [60] *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, s. 10-33. ISBN 80-86369-07-2.
- [61] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013, 2 sv. (299, 235 s.). ISBN 978-80-260-4243-3.
- [62] High Performance Liquid Chromatography (HPLC) : Principle, Types, Instrumentation and Applications. *Laboratory info* [online]. [cit. 2015-12-02]. Dostupné z: <http://laboratoryinfo.com/hplc/#prettyPhoto>
- [63] SWARTZ, Michael. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. *Journal of Liquid Chromatography*. 2010, **33**(9-12), 1130-1150. DOI: 10.1080/10826076.2010.484356. ISSN 1082-6076. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2010.484356>
- [64] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013, 2 sv. (299, 235 s.). ISBN 978-80-260-4244-0.
- [65] *Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích*. 2. ČSKB ČLS JEP, 2010.
- [66] BRADOVÁ, Oľga. SLOVENSKÁ REPUBLIKA. *VALIDÁCIA SKÚŠOBNÝCH METÓD: Všeobecné zásady a požiadavky*. In: . Bratislava, 2013, číslo 2.
- [67] VEIZEROVÁ, Lucia. *VALIDÁCIA a SPRÁVNA LABORATÓRNA PRAX*. Bratislava, 2014.
- [68] JIANG, Shujing, Qi LIU, Yixi XIE, Hualiang ZENG, Li ZHANG, Xinyu JIANG a Xiaoqing CHEN. Separation of five flavonoids from tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn) grains via off-line two dimensional high-speed counter-current chromatography. *Food Chemistry*. 2015, **186**, 153-159. DOI:

- 10.1016/j.foodchem.2014.08.120. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614013454>
- [69] DEINEKA, V. I., A. M. GRIGOR'EV a V. M. STAROVEROV. HPLC ANALYSIS OF FLAVONOIDS: DETERMINING RUTIN IN PLANT EXTRACTS. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2004, **38**(9), 487-489.
- [70] LIAO, Jianqing, Baida QU, Da LIU a Naiqin ZHENG. New method to enhance the extraction yield of rutin from *Sophora japonica* using a novel ultrasonic extraction system by determining optimum ultrasonic frequency. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2015, **27**, 110-116. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2015.05.005. ISSN 13504177. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417715001340>
- [71] KICEL, Agnieszka, Aleksandra OWCZAREK, Piotr MICHEL, Krystyna SKALICKA-WOŹNIAK, Anna K. KISS a Monika A. OLSZEWSKA. Application of HPLC, UHPLC-PDA-ESI-MS3 and HPLC-PDA methods for rapid, one-step preparative separation and quantification of rutin in *Forsythia* flowers. *Industrial Crops and Products*. 2015, **76**, 86-94. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.06.019. ISSN 09266690. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015301941>
- [72] LEE, Eun Jin, Kil Sun YOO a Bhimanagouda S. PATIL. Development of a Rapid HPLC-UV Method for Simultaneous Quantification of Protodioscin and Rutin in White and Green Asparagus Spears. *Journal of Food Science*. 2010, **75**(9), C703-C709. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01824.x. ISSN 00221147. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01824.x>
- [73] SUN, Yinshi, Jianhua WANG, Shubo GU, Zhengbo LIU, Yujie ZHANG a Xiaoxia ZHANG. Simultaneous Determination of Flavonoids in Different Parts of *Citrus reticulata* 'Chachi' Fruit by High Performance Liquid Chromatography—Photodiode Array Detection. *Molecules*. 2010, **15**(8), 5378-5388. DOI: 10.3390/molecules15085378. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/15/8/5378>
- [74] ZHENG, GuoDong, DePo YANG, DongMei WANG, Fang ZHOU, Xue YANG a Lin JIANG. Simultaneous Determination of Five Bioactive Flavonoids in Pericarpium *Citri Reticulatae* from China by High-Performance Liquid Chromatography with Dual Wavelength Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

- 2009, **57**(15), 6552-6557. DOI: 10.1021/jf901225e. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf901225e>
- [75] SILVA, Lidércia C. R. Cerqueira e, Jorge M. DAVID, Rafael dos S. Q. BORGES, Sérgio L. C. FERREIRA, Juceni P. DAVID, Pedro S. dos REIS a Roy E. BRUNS. Determination of Flavanones in Orange Juices Obtained from Different Sources by HPLC/DAD. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2014, **2014**, 1-5. DOI: 10.1155/2014/296838. ISSN 2090-8865. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/jamc/2014/296838/>
- [76] GORINSTEIN, S., H., D. HUANG, et al. DETERMINATION OF NARINGIN AND HESPERIDIN IN CITRUS FRUIT BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF CITRUS FRUIT. *ACTA CHROMATOGRAPHICA*. 2006, (17), 108-124.
- [77] MARTEN, Silvia. Determination of Naringine and Hesperidine in Fruit Juices. *Kanuer*. 2007, 1-4
- [78] WEON, Jin Bae, Hye Jin YANG, Jin Yeul MA a Choong Je MA. Simultaneous determination of six active components in traditional herbal medicine 'Oyaksungisan' by HPLC-DAD. *Journal of Natural Medicines*. 2012, **66**(3), 510-515. DOI: 10.1007/s11418-011-0617-8. ISSN 1340-3443. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11418-011-0617-8>
- [79] KANAZE, Feras Imad, Chrysi GABRIELI, Eugene KOKKALOU, Manolis GEORGARAKIS a Ioannis NIOPAS. Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003, **33**(2), 243-249. DOI: 10.1016/S0731-7085(03)00289-9. ISSN 07317085. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708503002899>
- [80] GASPARETTO, João C., Thais M. GUIMARÃES DE FRANCISCO, Francinete R. CAMPOS a Roberto PONTAROLO. Simultaneous Determination of Coumarin, O-Coumaric Acid, Dihydrocoumarin and Syringaldehyde in Guaco Extracts and Pharmaceutical Preparations by HPLC-DAD. *Pharmaceutica Analytica Acta*. 2011, **2**(10), -. DOI: 10.4172/2153-2435.1000145. ISSN 21532435. Dostupné ta-

- ké z: <http://www.omicsonline.org/simultaneous-determination-of-coumarin-o-coumaric-acid-dihydrocoumarin-2153-2435.1000145.php?aid=3532>
- [81] YANG, Rongjing, Biwen WEI, Huan GAO a Wenjia YU. Determination of five coumarins in toys by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*. 2012, **30**(2), 160-164. DOI: 10.3724/SP.J.1123.2011.10001. ISSN 1000-8713. Dostupné také z: <http://pub.chinasciencejournal.com/article/getArticleRedirect.action?doiCode=10.3724/SP.J.1123.2011.10001>
- [82] RP-HPLC gradient elution method in the determination of Aescin God capsule content of ginsenoside Rb3. In: *Research Papers Center: Pharmacy papers* [online]. 2009 [cit. 2016-01-27]. Dostupné z: http://eng.hi138.com/medicine-papers/pharmacy-papers/200909/131328_rphplc-gradient-elution-method-in-the-determination-of-aescin-god-capsule-content-of-ginsenoside-rb3.asp#.Vqk2w_nhDIV
- [83] CHEN, Junhui, Wenlong LI, Baijuan YANG, Xiuchun GUO, Frank Sen-Chun LEE a Xiaoru WANG. Determination of four major saponins in the seeds of *Aesculus chinensis* Bunge using accelerated solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography and electrospray-time of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2007, **596**(2), 273-280. DOI: 10.1016/j.aca.2007.06.011. ISSN 00032670. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267007010173>
- [84] ZHANG, Mengliang, Xiujun WU, Xiangyong CUI, Feng GAO, Chao ZHANG, Yan YANG a Jingkai GU. Simultaneous Determination of Escin Ia and Its Isomer Isoescin Ia by LC-MS-MS: Application to a Pharmacokinetic Study of Escin Ia in Rats. *Chromatographia*. 2011, **74**(3-4), 243-250. DOI: 10.1007/s10337-011-2053-z. ISSN 0009-5893. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10337-011-2053-z>
- [85] NUEVAS-PAZ, Lauro, Jorge MOLINA-TORRES a Sylvia PRIETO-GONZÁLEZ. Determination of Hypericin in *Hypericum* Species Grown in Cuba. *Acta Farm. Bonaerense*. 2004, **24**(1), 89-90. ISSN 0326-2383.

- [86] DE LOS REYES, GERLIE C. a ROBERT T. KODA. Determining hyperforin and hypericin content in eight brands of St. John's wort. *Am J Health-Syst Pharm.* 2002, **59**, 545-547.
- [87] CHEN, ML, LQ HUANG, B YANG, MH FU a YM LUO. [Determining the quantity of hypericin in medicinal materials and asepsis seedings of *Hypericum perforatum* by HPLC]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2003, **28**(11), 1013-1015.
- [88] GADZOVSKA, Sonja, Stéphane MAURY, Saida OUNNAR, et al. Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L. in vitro cultures. *Plant Physiology and Biochemistry.* 2005, **43**(6), 591-601. DOI: 10.1016/j.plaphy.2005.05.005. ISSN 09819428. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942805001294>
- [89] KAMAL, A., F.J. AHMAD, S. AHMAD a K. SALEEM. A Validated HPLC Method for the Quantification of Hypericin in *Hypericum perforatum*. *Asian Journal of Chemistry.* 2012, **24**(10), 4689-4692.
- [90] SHI, Zhihong, Xiaomin ZHU a Hongyi ZHANG. Micelle-mediated extraction and cloud point preconcentration for the analysis of aesculin and aesculetin in *Cortex fraxini* by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2007, **44**(4), 867-873. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.03.035. ISSN 07317085. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708507002014>
- [91] ACHYUT BHARADWAJ, S., N. SRINIVAS, E. RAJEEV REDDY, R. NAGARAJU, P. GOVERDHAN a E. VENKATESHWARLU. RAPID HPLC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ESCULIN. *Journal of Chemical and Pharmaceutical sciences.* 2011, **4**(3), 119-121. ISSN 0974-2115.
- [92] REHMAN, Shaheed Ur, In Sook KIM, Ki Sung KANG a Hye Hyun YOO. HPLC Determination of Esculin and Esculetin in Rat Plasma for Pharmacokinetic Studies. *Journal of Chromatographic Science.* 2015, **53**(8), 1322-1327. DOI: 10.1093/chromsci/bmv014. ISSN 0021-9665. Dostupné také z: <http://chromsci.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/chromsci/bmv014>
- [93] HAMID, Rehana, Azra N. KAMILI, MAHMOODUZZAFAR, Salih GÜCEL, Münir ÖZTÜRK a Parvaiz AHMAD. Analysis of physiobiochemical attributes, some key antioxidants and esculin content through HPLC in in vitro grown *Cichorium*

intybus L. treated with ethylmethane sulfonate. *Plant Growth Regulation*. 2015, **76**(3), 233-241. DOI: 10.1007/s10725-014-9992-y. ISSN 0167-6903. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10725-014-9992-y>

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

UV-B	ultrafialové žiarenie B
TNF- α	tumor nekrotizujúci faktor α
TGF- β	transformačný rastový faktor β
ppm	parts per milion
CVI	chronická žilová nedostatočnosť
ATP	adenozíntrifosfát
AFB1	aflatoxín B1
cm	centimeter
mg	miligram
g	gram
HIV-1	vírus nedostatku ľudskej imunity 1
NOS	syntáza oxidu dusnatého
NO	oxid dusnatý
CYP	cyklofosfamid
PPAR	receptor aktivovaný proliferátorom peroxizómov
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
RP-HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na reverznej fáze
t_r	retenčný čas
V_R	retenčný objem
h	výška píku
w	šírka píku
N	počet teoretický poschodí
A_s	asymetria píku
R_s	rozlíšenie píkov

k	retenčný faktor pri izokraticej elúcii
F_m	objemový prietok
w_{50}	polovičná šírka píku
n_p	kapacita separácie
t_M	mŕtvy čas kolóny
V_M	mŕtvy objem kolóny
k_e	retenčný faktor pri gradientovej elúcii
b_g	strmosť gradientu
T_f	faktor chvostovania
f	vzostupná časť píku
t	zostupná časť píku
ICH	<i>The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
LOD	limit detekcie
LOQ	limit stanoviteľnosti
ACN	acetonitril
UV-VIS	detektor ultrafialového a viditeľného žiarenia
DAD	detektor diodového pola
nm	nanometer
MS	hmotnostný detektor
FL	fluorescenčný detektor
M	molarita
mM	milimolárny
mg/l	hmotnostná koncentrácia
μ l	mikroliter
mm	milimeter

ml	mililiter
d	vzdialenosť medzi kolmicou spustenou zo stredu vrcholu píku a vzostupnou časťou v 1/20 jeho výšky
SD	smerodajná odchýlka
RSD	relatívna smerodajná odchýlka

ZOZNAM OBRÁZKOV

<i>Obr. 1. Všeobecná štruktúra flavonoidov a číslovanie [8, s. 3249].....</i>	13
<i>Obr. 2. Chemická štruktúra rutínu [13].....</i>	15
<i>Obr. 3. Chemická štruktúra hesperidínu [19].....</i>	15
<i>Obr. 4. Chemická štruktúra naringínu [21].....</i>	16
<i>Obr. 5. Chemická štruktúra dihydrokumarínu [23].....</i>	17
<i>Obr. 6. Chemická štruktúra beta-escínu [26]</i>	17
<i>Obr. 7. Chemická štruktúra eskulínu [32]</i>	18
<i>Obr. 8. Chemická štruktúra hypericínu [37].....</i>	19
<i>Obr. 9. Niektoré zo substituovaných dihydrokumarínov [22, s. 5].....</i>	26
<i>Obr. 10. Schéma vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie [62].....</i>	31
<i>Obr. 11. Grafické znázornenie výpočtu asymetrie píku [61, s. 17].....</i>	34
<i>Obr. 12. Chromatogram metód 1, 2 a 3 pri použití kolóny XSelect®.....</i>	51
<i>Obr. 13. Chromatogram metódy 4 pri použití kolóny XSelect®.....</i>	51
<i>Obr. 14. Chromatogram metódy 3 so zníženým prietokom 0,8 ml/min. (čierny chromatogram) a 0,5 ml/min. (červený chromatogram) použití kolóny Kinetex</i>	52
<i>Obr. 15. Chromatogram zmesi štandardov rutínu, hesperidínu, naringínu, dihydrokumarínu a eskulínu</i>	53
<i>Obr. 16. Chromatogram štandardu escínu</i>	55
<i>Obr. 17. Chromatogram štandardu hypericínu analyzovaný metódou III</i>	56
<i>Obr. 18. Absorpčné spektrum rutínu</i>	57
<i>Obr. 19. Absorpčné spektrum hesperidínu</i>	58
<i>Obr. 20. Absorpčné spektrum naringínu</i>	58
<i>Obr. 21. Absorpčné spektrum dihydrokumarínu</i>	59
<i>Obr. 22. Absorpčné spektrum eskulínu</i>	59
<i>Obr. 23. Absorpčné spektrum escínu</i>	60
<i>Obr. 24. Absorpčné spektrum hypericínu</i>	60
<i>Obr. 25. Kalibračná krivka pre rutín (metóda I)</i>	63
<i>Obr. 26. Kalibračná krivka pre hesperidín (metóda I).....</i>	64
<i>Obr. 27. Kalibračná krivka pre naringín (metóda I).....</i>	65
<i>Obr. 28. Kalibračná krivka pre dihydrokumarín (metóda I).....</i>	66
<i>Obr. 29. Kalibračná krivka pre eskulín (metóda I)</i>	67
<i>Obr. 30. Kalibračná krivka pre escín (metóda II)</i>	68

<i>Obr. 31. Kalibrační krivka pre hypericín (metóda III)</i>	<i>69</i>
<i>Obr. 32. Chromatogram extraktu ľubovníka analyzovaného metódou I</i>	<i>76</i>
<i>Obr. 33. Chromatogram extraktu pohánky analyzovanej metódou I</i>	<i>76</i>
<i>Obr. 34. Chromatogram extraktu grepu analyzovaného metódou I.....</i>	<i>77</i>
<i>Obr. 35. Chroamtogram gaštanu analyzovaného metódou II</i>	<i>77</i>

ZOZNAM TABULIEK

<i>Tab. 1. Podskupiny flavonoidov, ich chemické vlastnosti a významné zdroje [5, s. 307], [8, s. 3249]</i>	14
<i>Tab. 2. Chromatografické podmienky analýzy rutínu uvedené v publikáciach [68, s. 154–155], [69, s.487], [70, s. 113], [71, s. 88], [72, s. 705].....</i>	37
<i>Tab. 3. Chromatografické podmienky analýzy naringínu a hesperidínu uvedené v publikáciach [73, s. 5378], [74, s. 6554], [75, s. 2], [76, s. 108, 111], [77, s. 2], [78, s. 512], [79, s. 244]</i>	38
<i>Tab. 4. Chromatografické podmienky analýzy dihydrokumarínu uvedené v publikáciach [24, s. 740, 742], [80, s. 2], [81, s. 161]</i>	39
<i>Tab. 5. Chromatografické podmienky analýzy escínu uvedené v publikáciach [82], [83, s. 273, 375], [84, s. 243–244].....</i>	40
<i>Tab. 6. Chromatografické podmienky analýzy hypericínu uvedené v publikáciach [85, s. 90], [86, s. 546], [87, s. 1013], [88, s. 599], [89, s. 4689].....</i>	41
<i>Tab. 7. Chromatografické podmienky analýzy eskulínu uvedené v publikáciach [90, s. 869], [91, s. 119], [92, s. 1322], [93, s. 235].....</i>	42
<i>Tab. 8. Kocnetrácie kalibračných roztokov</i>	47
<i>Tab. 9. Riedenie extraktov a návažky štandardov pre stanovenie prestnosti a správnosti</i>	48
<i>Tab. 10. Chromatografické podmienky analýzy I.....</i>	49
<i>Tab. 11. Gradienty použité pri vývoji analytickej metódy I.....</i>	50
<i>Tab. 12. Chromatografické podmienky analýzy II</i>	52
<i>Tab. 13. Výsledné chromatografické podmienky pre analýzu rutínu, hesperidínu, naringínu, dihydrokumarínu a eskulínu (Metóda I)</i>	53
<i>Tab. 14. Gradienty použité pri vývoji metódy II pre analýzu escínu. Rozpúšťadlo A je vodný roztok 0,5% kyseliny octovej, B je acetonitril, C je metanol a D je 10 mM amónium acetát.</i>	54
<i>Tab. 15. Výsledné chromatografické podmienky pre analýzu escínu (Metóda II)</i>	54
<i>Tab. 16. Výsledné chromatografické podmienky pre analýzu hypericínu (Metóda III)</i>	55
<i>Tab. 17. Absorpčné maximá pre jednotlivé bioaktívne látky</i>	56
<i>Tab. 18. Počet teoretických poschodí</i>	61
<i>Tab. 19. Asymetria píkov</i>	62
<i>Tab. 20. Parametre lineárnej regresie pre rutín</i>	63

<i>Tab. 21. Parametre lineárnej regresie pre hesperidín</i>	64
<i>Tab. 22. Parametre lineárnej regresie pre naringín</i>	65
<i>Tab. 23. Parametre lineárnej regresie pre dihydrokumarín</i>	66
<i>Tab. 24. Parametre lineárnej regresie pre eskulín</i>	67
<i>Tab. 25. Parametre lineárnej regresie pre escín</i>	68
<i>Tab. 26. Parametre lineárnej regresie pre hypericín</i>	69
<i>Tab. 27. Opakovateľnosť pre metódu I</i>	70
<i>Tab. 28. Opakovateľnosť pre metódu II</i>	70
<i>Tab. 29. Presnosť metódy I</i>	71
<i>Tab. 30. Presnosť pre metódu II</i>	71
<i>Tab. 31. Správnosť metódy I</i>	72
<i>Tab. 32. Správnosť metódy II</i>	72
<i>Tab. 33. Stanovované bioaktívne látky v rastlinných extraktoch (zadanie firmy Nobilis Tilia s.r.o.)</i>	73
<i>Tab. 34. Množstvo bioaktívnych látok v jednotlivých rastlinných extraktoch analyzovaných metódou I</i>	74
<i>Tab. 35. Množstvo bioaktívnych látok v jednotlivých rastlinných extraktoch analyzovaných metódou II</i>	74
<i>Tab. 36. Množstvo bioaktívnych látok v jednotlivých rastlinných extraktoch analyzovaných metódou III</i>	74