

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie**

ANALÝZA BAICALEINU POMOCÍ HPLC-ED

Bakalářská práce

Autor práce:

František Doktor

Studijní obor:

CHEMIE

Forma studia:

Prezenční

Vedoucí bakalářské práce

Doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.

Olomouc 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především svému vedoucímu práce Doc. RNDr. Davidu Jirovskému, Ph.D. za ochotu, odborný dohled a mnoho cenných rad, které mi poskytl při psaní mé bakalářské práce.

Dále bych chtěl poděkovat svým rodičům za trpělivost a podporu po celou dobu studia.

Bibliografické identifikace:

Jméno a příjmení autora:	František Doktor
Název práce:	Analýza baicaleinu pomocí HPLC-ED
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta UP
Vedoucí práce:	doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020

Abstrakt:

Tato práce se zabývá analýzou flavonoidu baicaleinu, který je obsažen především v rostlině šišák bajkalský (*Scutellaria baicalensis*) a jemu příbuzných druzích, pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. K detekci byl použit elektrochemický (coulometrický) detektor.

Testovány byly dvě komerční tinktury volně dostupné v České republice a jedna vlastní tinktura připravená tradičním způsobem macerace v 50 % lihu po dobu 12 týdnů. Analýzou bylo zjištěno, že jednotlivé tinktury obsahují rozdílná množství baicaleinu. Ke kvantifikaci baicaleinu ve vybraných vzorcích byly zvoleny dvě metody, metoda standardního přídatku a metoda vnějšího standardu. Zjištěné koncentrace baicaleinu se v tinkturách pohybovaly od 0,337 do 4,016 mg/ml, přičemž největší koncentraci baicaleinu obsahoval vlastní vzorek tinktury připravený macerací.

Klíčová slova: šišák bajkalský, baicalein, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, tradiční medicína, coulometrický detektor

Počet stran:	45
Počet příloh	3
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author:	Frantisek Doktor
Title:	Analysis of baicalein using HPLC-ED
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Czech Republic
Supervisor:	doc. RNDr. David Jirovsky, Ph. D.
The year of presentation:	2020

Annotation:

This study deals with analysis of flavonoid baicalein, which is contained primarily in Chinese skullcap (*Scutellaria baicalensis*) and related species, by high-performance liquid chromatography. A high-performance liquid chromatography with dual-channel coulometric detection was used for baicalein determination.

Two commercial tinctures freely available in the Czech Republic and one self-made tincture were tested. A traditional extraction procedure using maceration of dried chopped root in 50% ethyl alcohol for 12 weeks was used. The standard addition and external standard methods were used for baicalein quantification. The concentration of baicalein detected in the tinctures ranged from 0,337 to 4,016 mg/ml, The highest amount of baicalein was found in the self-made tincture sample prepared by maceration.

Keywords: Chinese skullcap, baicalein, high-performance liquid chromatography, traditional medicine, coulometric detector

Number of pages:	45
Number of appendices:	3
Language:	Czech

OBSAH

1.	Úvod	8
2.	Teoretická část	9
2.1.	Flavonoidy	9
2.2.	Šišák bajkalský (<i>Scutellaria baicalensis</i>)	12
2.2.1.	Botanický popis	12
2.2.2.	Radix scutellariae	13
2.2.3.	Využití v tradiční medicíně	14
2.2.4.	Flavonoidy <i>S. baicalensis</i>	15
2.2.5.	Farmakologické účinky hlavních flavonoidů	16
2.2.6.	Droga a její využití	17
2.2.7.	Toxicita	19
2.3.	Kapalinová chromatografie	20
2.3.1.	Detektory	21
2.4.	Analytické metody používané při analýze baicaleinu	25
2.4.1.	Voltametrie	25
2.4.2.	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	27
3.	Experimentální část	30
3.1.	Instrumentální vybavení	30
3.2.	Chemikálie	30
3.2.1.	Rostlinný materiál	30
3.2.2.	Vzorky tinktur	30
3.2.3.	Informace o tinkturách uváděné výrobcem	30
3.3.	Pracovní postup	31
3.3.1.	Zpracování a příprava vzorků	31
3.3.2.	Příprava standardu	32
3.3.3.	Příprava mobilní fáze	32

3.3.4. Metody použité při kvantifikaci baicaleinu	32
3.4. Experimentální podmínky	34
4. Výsledky a diskuse	35
4.1. Hydrodynamický voltamogram	35
4.2. Vliv pH pufru	37
4.3. Vliv složení mobilní fáze	38
4.4. Analýza vzorků tinktur	40
4.5. Kvantifikace vzorků tinktur	42
4.5.1. Shrnutí výsledků	45
5. Závěr	47
6. Použitá literatura:	48
7. Obrazová příloha	53

1. Úvod

Tradiční léčitelství patří i v dnešní době mezi často využívané formy léčby. I když ustoupilo před farmaky produkoványými farmaceutickými společnostmi, tak pořád má své uplatnění. Jako všechno ostatní i tradiční medicína jde s dobou a postupně se modernizuje. Už to nejsou babky kořenářky, které za dávných dob sbíraly byliny v lese, sušily a pomocí nich léčily.

V dnešní době jsou léčebné přípravky, které se vyrábějí z přírodních materiálů, testovány v laboratořích a jsou detailně zkoumány jejich účinky na organismus. Například v Japonsku jsou přípravky tradiční medicíny regulovány ministerstvem zdravotnictví a v Číně se výzkumem v oblasti tradiční medicíny se věnuje nejeden tým akademiků. V Evropě je užívání těchto přípravků přísně regulováno Evropskou unií a podle Nařízení ES 1924/2006 o zdravotních tvrzeních a 1169/2011 o léčebných tvrzeních není umožněno podávat informace k léčebné rostlině. Na trhu se tedy vyskytuje mnoho (celá řada) přípravků, které nejsou nijak kontrolovány a mohou tudíž obsahovat jen malá množství účinných látek nebo mohou být dokonce zcela neúčinné. Jelikož se výrobci a prodejci nechtějí dostat do konfliktu se zákonem tak poskytují velmi strohé informace o účincích přípravku, takže praktické využití při léčbě je velmi malé.

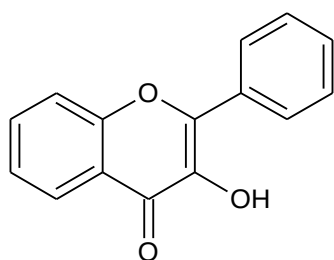
Cílem této je práce provést analýzu přípravků a stanovení množství účinné látky baicaleinu, který je přítomen ve velkém množství v rostlině šišák bajkalský. Baicalein patří mezi flavonoidy a je široce využíván v tradiční medicíně, jelikož vykazuje protizánětlivé, antivirové, antibakteriální, protinádorové a sedativní účinky. Ke stanovení baicaleinu byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s coulometrickým detektorem. Coulometrická detekce se jeví jako výhodná, protože se baicalein velmi snadno oxiduje a také proto, že se vyznačuje vysokou selektivitou, která je dobře využitelná pro analýzu vzorků rostlinných materiálů.

2. Teoretická část

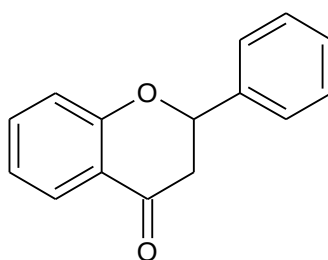
2.1. Flavonoidy

Flavonoidy jsou skupina polyfenolických sloučenin, které mají různé chemické struktury a charakteristiky. V přírodě se vyskytují v ořechách, semenech, zelenině, ovoci, květech, kůře a kořenech, a tím pádem jsou nedílnou součástí lidské stravy. V dnešní době je známo, že flavonoidy vykazují širokou škálu biologických účinků (antibakteriální, antivirové, protizánětlivé, anti-alergické) [1].

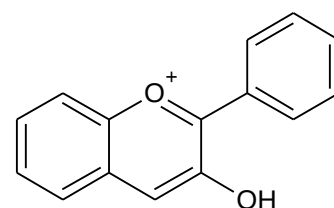
Chemická struktura a relativní orientace různých funkčních skupin na molekule zásadně ovlivňují biochemickou aktivitu flavonoidů a jejich metabolitů. Flavonoidy se rozrůžňují podle jejich chemických struktur do hlavních skupin, mezi které patří flavanoly, flavony, flavonony, katechiny, anthokyanidy, isoflavony, dihydroflavonoly, chalkony [1].



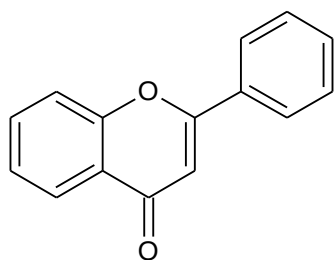
flavanoly



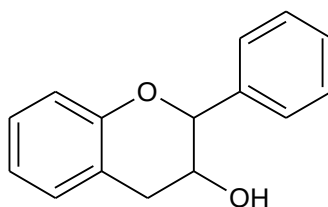
flavonony



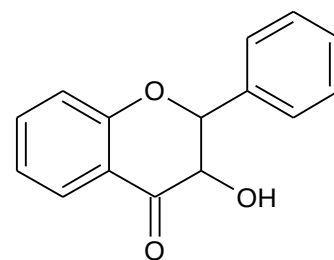
anthokyanidiny



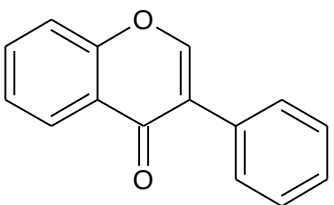
flavony



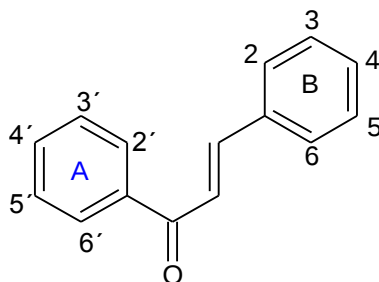
katechiny



dihydroflavonoly



isoflavony



chalkony

Obr. 1 - Struktury hlavních skupin flavonoidů

V rostlinách působí jako antioxidanty, antimikrobiální látky, fotoreceptory, vizuální atraktory a pro světelný screening. V poslední době však asi největší zájem o flavonoidy vyvolává jejich antioxidační aktivita. Flavonoidy mají totiž schopnost buď tvorbu škodlivých volných radikálů potlačit, nebo je zcela eliminovat. Velmi dobře jsou popsány antioxidační účinky flavonoidů *in vitro*, zatímco antioxidační schopnost flavonoidů je zdokumentována mnohem méně. Většina flavonoidů se ve velké míře v těle rozkládá na různé fenolové kyseliny, které mají schopnost odstraňovat radikály [2, 3].

Oxidace znamená přenos elektronů z jednoho atomu na druhý a je základním stavebním kamenem aerobního života a našeho metabolismu, jelikož je kyslík posledním akceptorem elektronů v systému toků elektronů, který je producentem energie ve formě ATP. Problém však může nastat, pokud se tok elektronů odpojí a vytvoří se tím volné radikály. Příklady volných kyslíkových radikálů, které se nazývají reactive oxygen species (ROS), jsou superoxid ($O_2^{\cdot-}$), peroxy ($ROO^{\cdot}$), alkoxy ($RO^{\cdot}$), hydroxyl ($HO^{\cdot}$) a oxid dusnatý ($NO^{\cdot}$). Mimo výše uvedených radikálů se vyskytují v živých organismech další neradikály ROS, což je singletový kyslík (1O_2), peroxid vodíku (H_2O_2) a kyselina chlorná ($HClO$) [2,3].

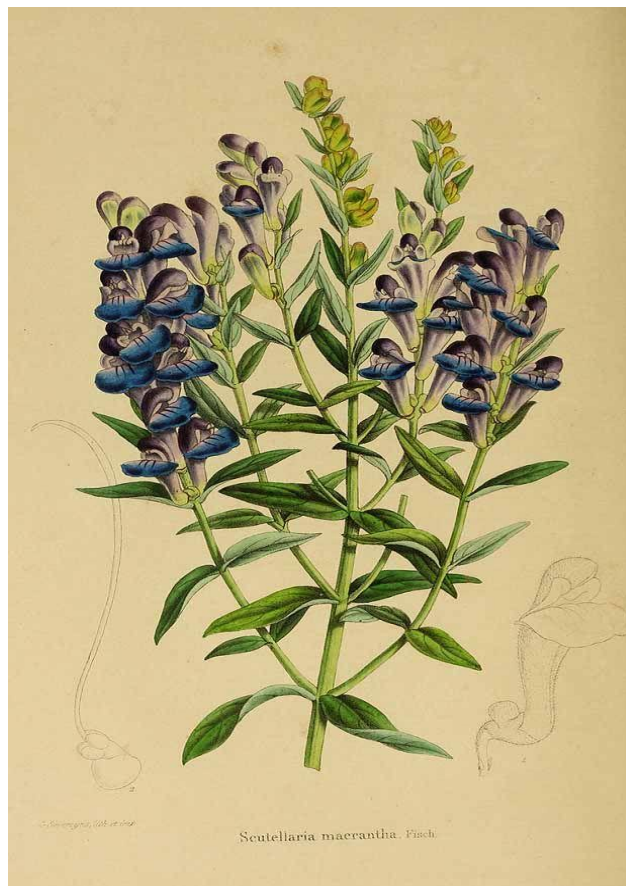
Je obecně známo, že ROS mají různé role *in vivo*. Některé vlivy jsou pozitivní a souvisí s jejich účastí na produkci energie, fagocytóze, regulaci buněčného růstu a mezibuněčné signalizaci a syntéze biologicky důležitých sloučenin. Avšak některá ROS mohou být velmi škodlivé, jelikož mají schopnost napadat lipidy v buněčných membránách, proteiny v tkáních nebo enzymech, uhlovodících a DNA způsobovat oxidaci, což způsobuje poškození membrány, modifikaci proteinů nebo poškození DNA. Tato poškození jsou příčinou několika degenerativních onemocnění [2].

Člověk má dobře vyvinuté antioxidační systémy, které ho ochraňují před volnými radikály. Lidé si dokážou syntetizovat některé antioxidanty v těle, další část antioxidantů získávají z potravy [2,3]. Lidé shromažďují byliny už od starověku a spousta fytochemikálií byla vyextrahována právě z léčivých bylin a použita při léčbě různých onemocnění. Hlavním zdrojem polyfenolu je široká škála potravin obsahujících fytonutrienty, jako je většina luštěnin, ovoce včetně jablek, ostružin, třešní, brusinek, hroznů, hrušek, švestek, malin a jahod a zeleniny včetně brokolice, zelí, celeru, cibule a petržel.

Flavonoidy jsou hlavními funkčními součástmi mnoha bylinných přípravků užívaných v lékařství. Tyto léky patří k nejbezpečnějším, jelikož je nezávadnost prověřena generacemi našich předků. I když jsou flavonoidy ve světě rozšířené, docela dobře prozkoumané, tak díky velkému množství různých struktur je přesto jejich léčebný potenciál stále obrovský. Funkční sloučeniny rostlin mohou posloužit jako výchozí látky pro vývoj optimálních derivátů. Stále existuje potřeba vyvíjet deriváty flavonoidů pro konkrétnější a účinnější léčbu a zároveň udržet nízkou toxicitu. V blízké budoucnosti by mohla být řada nemocí léčena pomocí flavonoidů nebo jejich derivátů [4].

Od objevu, že volné radikály jsou odpovědné za celou řadu patologií, byl obnoven zájem o přípravky z rostlin jako zdroj přírodních antioxidantů, které nahrazují syntetické přípravky používané v medicíně, kosmetice a jídle [5].

2.2. Šišák bajkalský (*Scutellaria baicalensis*)



Obr. 2 - šišák bajkalský[6]

2.2.1. Botanický popis

Scutellaria baicalensis Georgi z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*) je vytrvalá kvetoucí rostlina. *Scutellaria baicalensis* je 30-60 cm vysoká bylina. Má vřetenovitý, kolem 2 cm tlustý kořen na povrchu hnědý a na řezu bledě žlutý. Plod je vejcovitá, plochá a drobná tvrdka červenohnědé barvy.[7] Stonek je vzpřímený, polopoléhavý, rozvětvený, řídce a krátce chlupatý. Listy má vstřícné, přisedlé, kopinaté, jasně zelené. Květy jsou tvořeny vrchovitými hroznovitými květenstvími a květy mají modrou až modrofialovou barvu (viz. Obr. 26) [8].

Název *Scutellaria* nebo také anglicky *Skullcap* je odvozen od tvaru kališních lístků, které leží na spodní části květů. Skládají se ze dvou pysků, horní pysk je složen z víčka

(kápě, kapuce) a dolní pysk je složen ze dvou mělkých laloků. Celkově tvar lístků připomíná zmenšenou verzi středověké helmy [9].

Volně v přírodě se vyskytuje hlavně v lesích a lesostepích východního Zabajkalí, na středním toku Amuru, v Severní Koreji, v Číně, Japonsku a Mongolsku. Nejčastěji roste na přímém slunci i v polostínu na sušších, kamenitých a štěrkovitých svazích [7]. V mnoha evropských zemích došlo ke kultivaci této rostliny [10].

Nejdůležitější částí z hlediska obsahu účinných látek je kořen rostliny, který se nazývá *radix scutellarie*. V kořenech (*Scutellariae baicalensis radix*) je obsaženo na 40 různých flavonoidů v množství 4-4,5 %, např. baicalin, wogonosid a jejich aglykony baicalein a wogonin. Dále kořen obsahuje glykosid scutellarin, steroly (do 7%), např. β -sitosterol a kampestreol, kyselinu benzoovou, iridoidy, třísloviny (pyrokatechiny), pryskyřice (2-5 %) aj. [7].

2.2.2. Radix scutellarie

Kořen je 5-25 cm dlouhý, průměr kořenu je 0,5 - 3,0 cm, má kuželovitý, zploštělý nebo překroucený tvar (viz. Obr. 27). Zevně má žluto-hnědou barvu, s hrubým a nápadným podélným zvrásněním a roztroušenými jizvami po boku kořene se zbytky hnědého pedimermu[11]. Má tvrdou strukturu, velmi snadno se láme a tříští. Povrch kořene je žlutý a vláknitý, ve středu je červenohnědý. Často bývá téměř bez zápachu, chuti nebo mírně hořký. Ve starém kořeni je často přítomen shnilý xylem [6-8].

Sklízí se kořeny tříletých rostlin, pokud dosahují alespoň hmotnosti 20 až 25 gramů, nejlépe v říjnu. Poté se suší umělým teplem do 60 °C [8].

2.2.3. Využití v tradiční medicíně

V **tradiční čínské medicíně** (TCM) se využívají blahodárné účinky suchého kořenu této léčivé rostliny více jak 2000 let. První historická zmínka o využití kořenu pochází již z 2. století př. n. l. a je zaznamenána v Shennong Bencaojing (The Classic of Herbal Medicine) z Dynastie Han. V tradiční medicíně je znám jako *Huang-Qin* což znamená zlatá rostlina, Huang „žlutá“ a qin „zlatá“. *Radix scutellarie* se používá pro léčbu průjmu, úplavice, vysokého tlaku, krvácení, nespavosti a dýchacím potížím [5,10].

V Severní Americe je šišák využíván domorodými Američankami k udržení zdravých menstruačních cyklů a po narození dítěte se užívá jeho odvar z kořene ke stimulaci reprodukovatelnosti. Dále je šišák používán při očišťovacích ceremoniálech pro mladé dívky, které začínají menstruuovat. Jiné domorodé kmeny užívají příbuzné druhy jako hořká tonika pro ledviny. Taktéž se bylina užívá při slavnostech k vyvolání vizí nebo je domorodými Američany kouřena jako tabák [13].

Mimo šišáku bajkalského se používá i šišák vousatý (*Scutellaria barbata*), užívá se při krvácení z nosu, krvi v moči, krvavém průjmu, zánětu krku i žloutence. Na Kavkaze a v Ázerbájdžánu roste na kamenitých svazích a pastvinách šišák východní (*Scutellaria orientalis*), který obsahuje 2,5 % flavonoidů, 0,68 % tříslovin, 4,5 % pryskyřice, sacharidy, vitamin C a minerální látky [7].

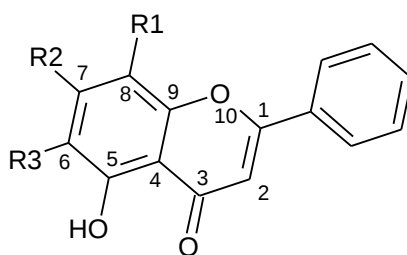
Kampo medicína patří v Japonsku mezi tradiční bylinné léčivé prostředky a je zde klasifikována jako léčivo. Vychází ze starověké tradiční čínské medicíny a vyvíjela se po dlouhou dobu do japonského originálního stylu. Kampo medicína hraje v japonském zdravotním systému zásadní roli, v dnešní době je evidováno 294 přípravků Kampo. Jsou rozděleny do dvou kategorií, kterými jsou produkty Kampo a surové drogové produkty jiné než Kampo. Výrobky Kampo jsou formulovány Kampo recepturami, které vydává ministerstvo zdravotnictví [14].

V Kampo medicíně se široce využívá šišák bajkalský ve směsi s dalšími bylinami. Je přítomen ve směsích Saiko-keishi-to, Bofu-tsusho-san, a Hange-shashin-to. Tyto přípravky se používají na léčbu horečky, kašle, úplavice, žloutenky, hepatitidy, hypertenze [15].

2.2.4. Flavonoidy *S. baicalensis*

V šířáku bajkalském a dalších druhů z rodu *Scutellaria* je obsaženo více než 295 látek. Mezi ně patří flavonoidy, fenylethanoidní glykosidy, iridoidní glykosidy, diterpeny, triterpeny, alkaloidy, fytosteroly a polysacharidy [16].

Bylo identifikováno na 40 flavonoidů, které se vyskytovaly i ve formě glykosidů. Baicalein, baicalin (baicalein-7-glukuronid), wogonin, wogonosid (wogonin-7-glukuronid), oroxylin A a oroxylin A-7-glukuronid jsou hlavní bioaktivní složky RS. Mezi další minoritní flavonoidy identifikované v RS patří viscidulin III-2'-ObD-glukosid, 5,7,2', 5'-tetrahydroxyflavon, (a) - eriodictyol a rivularin, chrysin 8-CbD-glukopyranosid a 5,2'-dihydroxy-6,7,8,3'-tetrametoxyflavon, skullcapflavon [11–14].



látka	R1	R2	R3
Baicalin	-H	-O-Glu	-OH
Baicalein	-H	-OH	-OH
Wogonosid	-OCH ₃	-O-Glu	-H
Wogonin	-OCH ₃	-OH	-H

Obr. 3 - Nejvíce prostudované flavonoidy z *S. baicalensis*[8]

2.2.5. Farmakologické účinky hlavních flavonoidů

Známé jsou účinky šesti hlavních bioaktivních flavonů (baicalein, baicalin, wogonin, wogonosid, oroxylin A, oroxylin A-7-glukuronid). Jedná se především o účinky protizánětlivé, antivirové, protirakovinné a na centrální nervový systém. Vzhledem k různým metodám nebo modelům, které byly použity v různých studiích je relevantní srovnání účinků šesti flavonů poněkud omezené [11-15].

Dále jsou uváděny rovněž účinky anti-alergické, anti-zánětlivé, anti-nádorové, antioxidační, antitrombózní, močopudný. Taktéž může být šišák bajkalský použit proti zvýšenému cholesterolu, proti viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) nebo k hepatoprotekci. V dnešní době jsou flavonoidy šišáku studovány pro možnou jejich neuroprotektivní účinky pomocí řady *in vitro* a *in vivo* modelů neurodegenerativních chorob [11]. Taktéž byla prokázána klinická bezpečnost užití extraktů *Scutellaria baicalensis* [21].

Baicalein a baicalin jsou bioaktivní látky. Bylo zpozorováno, že baicalein zamezuje tvorbě oxidu dusnatého, zatímco baicalin inhibuje vazby řady chemokinás na lidské leukocyty nebo na buňky transfektované k expresi specifických chemokinásových receptorů, čímž jsou prokázány jeho protizánětlivé účinky. Jelikož baicalin a baicalein mají antivirový účinek, mohly by inhibovat virus lidské imunodeficiency. baicalein má také schopnost blokovat syntézu lidského cytomegaloviru, kdežto baicalin snižuje produkci viru hepatitidy baicalein bez účinků na hostitelské buňky [11,15,17].

Wogonin a wogonosid jsou biologicky aktivní, mají antioxidační a antivirové účinky. Wogonin má protizánětlivé účinky. Oba flavonoidy vykazují významné účinky na peroxidaci lipidů indukovaných NADPH. Dále je wogonin silným apoptotickým induktorem mezi sedmi flavonoidy, které si jsou strukturně příbuzné (luteolin, nobiletin, wogonin, baicalein, apigenin, myricetin a fisetin) v lidské buněčné linii [11,15,17].

2.2.6. Droga a její využití

Protizánětlivý účinek

Baicalein a baicalin jsou účinné při léčbě chronických zánětlivých onemocnění jako je revmatoidní artritida, diabetes, respirační onemocnění, zánětlivé střevní onemocnění, kardiovaskulární onemocnění, onemocnění ledvin a další. Flavonoidy šišáku nemají téměř žádnou toxicitu pro normální lidské epiteliální, periferní a myeloidní buňky. Jejich antioxidační a protizánětlivé účinky jsou způsobeny jejich schopností zachytit reaktivní druhy kyslíku (ROS) a zlepšením antioxidačního stavu oslabením aktivity NF- κ B a potlačením exprese několika zánětlivých cytokinů a chemokinů, včetně syntázy oxidu dusnatého, cyklooxygenázy, lipxygenázy [22,23].

Použití při léčbě lymské boreliózy

Lymská borelióza je nejčastější onemocnění přenášené vektory v USA a Evropě. I přes účinnost lymských antibiotik trpí 10-20% pacientů nadále přetrvávajícími příznaky. V dnešní době je snaha použít bylinných extraktů pro léčbu pacientů přetrvávajícími příznaky, ovšem není stále jasné, zda je účinek bylinných extraktů způsoben jejich přímou antimikrobiální aktivitou nebo jejich účinkem na imunitní systém hostitele.

Bylo zjištěno, že 1% extrakt *Scutellaria baicalensis* má dobrou aktivitu proti stacionární fázi kultury *B. burgdorferi* v kontrastu s kontrolními antibiotiky doxycyklinem a cefuroximem. Ze všech aktivních složek *Scutellaria baicalensis* největší aktivit *in vitro* proti různým morfologickým formám *B. burgdorferi* a *B. garinii* vykazuje baicalein [21].

Antibakteriální a antivirový účinek

Mnoho bylinných a kořenových extraktů vykazuje podstatné antibakteriální účinky proti *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella anatum* a *Staphylococcus aureus*. Vodné výluhy se dají použít taktéž proti infekcím způsobených houbami. Baicalin vyizolovaný ze šišáku se dá aplikovat jako přírodní prostředek proti potravinovým patogenům jako jsou bakterie rodu *Salmonella* a *Stafylococcus*. Extrakt ze šišáku může být použit pro zvýšení antimikrobiální aktivity mnoha antibiotik. Některé přípravky z *S. baicalensis* jsou efektivní proti hepatitidě a u některých pacientů léčených pomocí Sho-saiko-to bylo pozorováno snížení virové zátěže [10].

V nedávné době se začaly zkoumat účinky přírodních látek pocházejících z bylin, které se užívají v tradiční východní medicíně na virus HIV. Ukázalo se, že baicalin je

dobry jako inhibitor HIV-1. Hlavním mechanismem je zabránění vstupu viru do živočišných buněk narušením interakce mezi koreceptory HIV-1 Env a HIV-1 na povrchu buněk [5,6].

Bylo zjištěno, že baicalein vykazuje inhibici sezónní replikaci viru chřipky A v buněčné kultuře a u myši docházelo ke zvyšování antivirových účinků ribavirinu. Taktéž baicalein inhibuje replikaci dvou různých kmenů H5N1. I když některé flavonoidy byly popsány jako narušitelé hostitelů buněčného příjmu chřipkových virů, ukázalo se, že baicalein působí až po adsorpci viru. V rámci virového replikačního cyklu inhibuje baicalein kritické kroky, včetně virem indukované aktivace kaspázy-3 a jaderného exportu virových ribonukleoproteinových komplexů. Baicalein narušuje replikaci H5N1 a H5N1-indukovanou expresi protizánětlivých genů v plicích epiteliálních buňkách a makrofázích [25].

Účinky proti COVID-19

Při infikování organismu skupinou virů SARS, dochází k navázání viru na enzym angiotenzin-konvertázy-2 (ACE-2) na povrchu buněk, který se nachází v mnoha buňkách (například v plicích). Tato vazba viru na ACE-2 zapříčiní vaskulární permeabilitu, otoky a obecně zhoršující funkci plic. Jednou z bylin, které dokážou chránit ACE-2 je i šiřák bajkalský, konkrétně baicalin [26].

Bylinný přípravek TCM (Traditional Chinese Medicine), který je připravován z kořene šiřáku bajkalského, by mohl inhibovat SARS-CoV-2. U tohoto přípravku byla již dříve prokázána inhibice syndromu a i silné antivirové a imunomodulační účinky. Nejenže dokázal blokovat raná stadia infekce viru chřipky, ale dokázal inhibovat i virově indukovanou expresi. Tudíž by mohl být tento přípravek použit při prevenci virových infekcí včetně SARS-Cov [27–29] .

Protinádorové účinky

Baicalein inhibuje různé typy rakoviny (např. rakovina močového měchýře, rakovina prsu, rakovina děložního čípku, rakovina žaludku a další). Mezi hlavní molekulární mechanismy protinádorových účinků baicaleinu patří inhibice několika cyklinů nebo cyklin-dependentních kináz (CdK) za účelem regulace buněčného cyklu, zeslabení aktivit MAPK (mitogenem aktivované proteinkinázy), inhibice nádorové invaze a metastázami snížením exprese MMP-2/-9 (matrix metalloproteinázy) [30].

Při vývoji nových léků proti rakovině se bere zřetel na minimalizaci vedlejších účinků, ale zároveň maximalizaci účinnosti přípravků. V posledních pár dekadách se ukazuje, že wogonin, baicalein a baicalin jsou silnými induktory apoptózy rakovinových buněk. Jelikož je *Radix Scutellaria* známá nízkou toxicitou pro člověka, tak díky široké toxicitě pro různé typy nádorových buněčných linií a malé toxicitě pro zdravé tkáně jsou výše zmíněné látky žhavými kandidáty na vývoj nových léčiv. Kromě wogoninu, baicaleinu a baicalinu je v šiřáku také řada minoritních flavonoidů, např. chrysin, luteolin, apigenin, jenž mají taky silně protinádorové účinky [31].

Množství důkazů ukazují, že se wogonin zaměřuje na klíčové molekuly, které hrají důležitou roli ve vývoji nádorů, ale také zvyšuje protinádorový účinek chemoterapeutických léčiv. Na základě výzkumů *in vitro* a *in vivo* byly zahájeny v Čínské lidové republice preklinické a klinické testy léků s wogoninem. V roce 2015 se lék nacházel v první fázi klinického vývoje [32].

Sedativní účinek

Vzhledem k tomu, že se flavonoidy šiřáku bajkalského mohou vázat na benzodiazepinové místo GABA_A receptorů, vykazují mnohé podobné vlastnosti jako syntetické benzodiazepiny. Díky této interakci dochází ke zvýšení aktivity GABA_A receptorů. Největší vazebnou sílu má wogonin, který zvyšuje přítok Cl⁻ do intracelulární oblasti [25–27].

2.2.7. Toxicita

Existují zprávy o vedlejších účincích po užívání přípravku orálně nebo pomocí injekce. Mezi vedlejší účinky patří žaludeční problémy nebo průjem. Byly nahlášeny, taktéž alergické reakce doprovázené objevením puchýřků hlavně v obličeji a na exponovaných částech končetin. Všechny tyto příznaky patří mezi méně vážné a jsou obvyklé u většiny látek [36].

Při zkombinování purifikované *Scutellaria baicalensis* a kůry *Acacia catechu*, jež obsahují koncentrovaný baicalin a katechin, došlo k reverzibilnímu poškození jater v nejméně 35 případech s vypočtenou odhadovanou incidencí přibližně 1 z 10 000. I přes případy hepatotoxicity byla dávka 1 000 mg/kg identifikována jako hladina bez pozorovaného nepříznivého účinku. V nedávné studii nebyla zjiřtěna hepatotoxicita u pacientů, kteří užívali 1 335 mg denně v průměru 444 dnů [22–24].

2.3. Kapalinová chromatografie

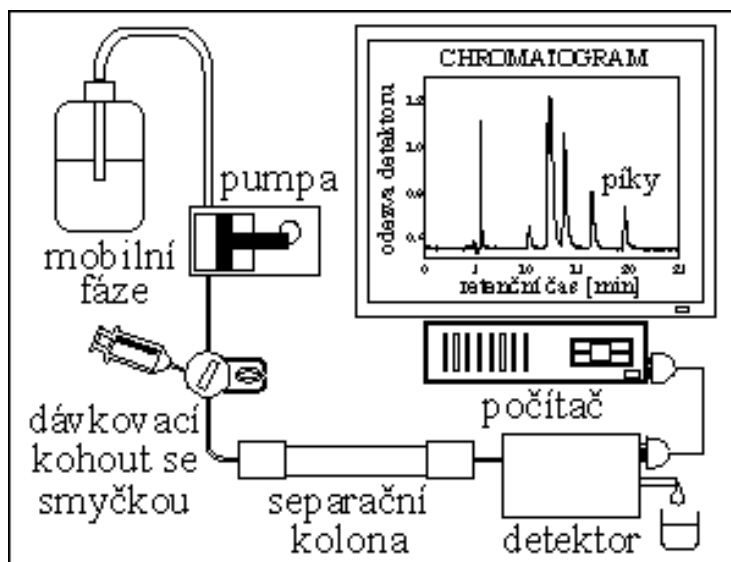
Patří mezi separační metody, tudíž rozděluje dělené látky ve směsi na základě různé distribuce separovaných látek ve směsi mezi dvě nesmíselné fáze: mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). Mobilní fáze v kapalinové chromatografii je kapalina, stacionární fáze je tvořena tuhou látkou nebo kapalinou, která je ukotvena na tuhém nosiči. Stacionární fáze se nachází v chromatografické koloně ve formě sorbentu. Mobilní fáze potom protéká tímto sorbentem, tzv. chromatografickým ložem. Nejhojnější uspořádání kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). V tomto systému je kapalina (mobilní fáze) přiváděna pomocí vysokotlakého čerpadla.

Mobilní fáze je tvořena buď čistým rozpouštědlem, nebo směsí mísitelných rozpouštědel. Nejčastěji se užívá směs méně polárního a polárnějšího rozpouštědla, např. hexan a isopropanol nebo methanol a voda. Při chromatografii na reverzních fázích je mobilní fáze polární. Obvykle je to směs vodné složky (voda, pufr) s polárními organickými rozpouštědly, která jsou mísitelná s vodou (methanol, acetonitril). Zatímco při separaci na normálních fázích se užívá mobilní fáze s nižší polaritou než má stacionární fáze. Většinou se jedná o binární směsi dvou rozpouštědel s odlišnou polaritou (např. alifatický uhlovodík-propanol, isopropanol)

Konstantní průtok mobilní fáze systémem je zajištěn vysokotlakou pumpou. Pístová pumpa se skládá z jednoho až dvou pístů, které jsou poháněny vačkou a tlumičem pulsů pro dosažení konstantního průtoku nastavené hodnoty. Vlastnosti stacionární fáze (polarita, ionizovatelnost) se různí podle vyžadovaného mechanismu separace.

Vzorek, který musí být rozpustný v mobilní fázi, nesmí nijak reagovat se stacionární fází. Vzorek je nastříkovan do systému dávkovacím ventilem, přičemž během dávkování nesmí být přerušen tok mobilní fáze mezi pumpou a kolonou [40–43].

Jednotlivé složky vzorku jsou separovány na základě jejich interakce se stacionární fází a mobilní fází. Separované zóny analytů vycházející z kolony jsou zaznamenány při průchodu detektorem a signál je převeden do podoby chromatografického záznamu (chromatogram). Chromatografický záznam je tvořen křivkami gaussovského tvaru, které jsou nazývány píky [42].



Obr. 4 - Schéma HPLC[44]

2.3.1. Detektory

Spektrofotometrické detektory

Princip těchto detektorů spočívá v absorpci záření v oblasti 190-800 nm, přičemž kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně ($A=l*\epsilon*c$). Kde (l) je tloušťka absorbující vrstvy, (c) je koncentrace absorbující složky a vlastní velikost absorpce, vyjádřenou jako (A).

Fluorescenční detektory

Detektory jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního emisního záření, které látka vydá po absorpci primárního excitačního elektromagnetického záření. Doba, při které trvá fotoluminiscence, je u fluorescence 10^{-8} až 10^{-5} sekundy.

Univerzální detektory na bázi aerosolu

Jsou takové detektory, které jsou schopny detekovat jakékoliv analyty bez ohledu na jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Dnešní detektory pracují na podobném principu v počátečních fázích, avšak liší se ve fázi finální a to principem detekce vzniklých částic.

- 1) ELSD (evaporative light scattering detector)- odpařovací detektor rozptylu světla (založený na bázi rozptylu světla)
- 2) CAD (charged aerosol detector) - detektor nabitého aerosolu
- 3) NQAD (nano quantity analyte detector)

Refraktometrické detektory

Refraktometrické detektory patří mezi nejstarší používané univerzální detektory, avšak mající řadu nevýhod např.: nízká citlivost, teplotní závislost, nutnost zachování konstantního průtoku mobilní fáze, nemožnost použití gradientové eluce. Odezva refraktometrického detektoru je úměrná rozdílu indexu lomu eluátu v měrné cele a indexu lomu mobilní fáze v referenční cele detektoru. Detektor bude tudíž citlivější, čím větší bude rozdíl mezi indexem lomu eluátu a indexem lomu mobilní fáze.

Vodivostní detektory

Vodivostní detektory se řadí do skupiny univerzálních detektorů, měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vkládáno střídavé napětí, aby bylo zabráněno polarizaci těchto elektrod. U těchto detektorů jsou kladeny vysoké nároky na mobilní fázi (měla by být nevodivá, rozpouštět všechny dělené látky a mít dostatečně velkou permitivitu).

Hmotnostně spektrometrická detekce

Tato detekce patří do skupiny spojených technik, poskytuje kromě údajů z chromatogramu spektrální údaje o identitě látky. V dnešní době mají (LC/MS) zásadní význam v analytické chemii. Systém identifikace uskuteční ve třech krocích:

1. ionizace vzorku
2. rozdělení iontů podle poměru m/z (hmotnost/náboj), jejich urychlení v analyzátoru
3. zesílení signálu v detektoru [40, 42, 43]

Elektrochemické detektory

Princip elektrochemických detektorů spočívá v měření určité elektrické veličiny (elektrodotový potenciál, proud), který je vyvolán průchodem látky průtokovou celou detektoru (v cele jsou situovány elektrody s vloženým pracovním napětím, jenž je nezbytný k průběhu reakce). Elektrický signál, který je změřen, je úměrný látkovému množství detekované složky, proto je u elektrochemických detektorů sledována závislost mezi elektrickou veličinou a koncentrací sledované složky. Nejrozšířenější je využití elektrochemické reakce redoxního systému $Ox^{n+} + ne^- \rightleftharpoons Red$. Elektrochemické detektory se užívají pro detekci látek, které mohou elektrochemicky reagovat na fázovém rozhraní elektroda - roztok (mobilní fáze).

Elektrochemické detektory se vyznačují vysokou citlivostí, která se může srovnávat s citlivostí fluorescenčních detektorů. Paleta využití elektrochemické detekce není příliš široká, avšak se využívá pro detekci látek ze skupiny důležitých léčiv, polutantů a přírodních produktů. Ovšem je kladen větší důraz na čistotu a dokonalost odplynění mobilní fáze, což je nutné k dosažení stabilní nulové linie a reprodukovatelnosti výsledků. Mobilní fáze musí být samozřejmě vodivá s co nejnižším obsahem organické složky ve vodně-organických mobilních fázích. Také je velmi důležité, aby mobilní fáze neobsahovala kyslík nebo částice kovů[40, 42, 43].

Amperometrické detektory tvoří nepoužívanější podskupinu elektrochemických detektorů. Tyto detektory měří proud, který je vyvolán průchodem redukované nebo oxidované látky průtokovou celou detektoru. Nejčastěji se používají tuhé měrné elektrody, které jsou vyrobené nejčastěji z grafitových vláken, skelného uhlíku, grafitu, nebo případně mědi, platiny, zlata či jiných kovů.

Při technickém provedení wall-jet je měrná elektroda přímo omývána eluátem, který vytéká z trysky. Průtokové měrné cely lze lehce transformovat pro práci s mikrokolonami nebo s kapilárními kolonami. Vnitřní objem průtokových cel se může snížit až na 1nl. Jako referentní elektroda se používá nejčastěji elektroda kalomelová či argentchloridová [40, 42, 43].

Princip **coulometrických detektorů** je měření náboje, který je potřebný k oxidaci či redukcí celkového množství látky při jejím průtoku měrnou celou. Díky tomu dosahují coulometrické detektory větší citlivosti detekce než amperometrické detektory. Při amperometrické detekci je účinnost elektrochemické reakce limitována difúzí elektroaktivních komponent k povrchu pracovní elektrody rychlostí průtoku mobilní fáze. To je podstatný rozdíl, protože coulometrický detektor na rozdíl od amperometrického není na průtoku mobilní fáze závislý.

Další výhodou coulometrické detekce je její vysoká účinnost, stabilita a selektivita. Pokud analyt je kvantitativně přeměněn na jedné z coulometrických elektrod, neposkytuje již signál na dalších sériových elektrodách. Oxidačně-redukční reakci na povrch elektrody tak podléhá více než 90 % přítomného analytu. Další pozitivem použití coulometrické

detekce je možnost zvýšení selektivity pomocí zapojení dvou a více elektrod v sérii (na elektrodách je vloženo různé napětí). Jelikož je analyt 100% elektrolyzován na coulometrické elektrodě, tak potom není žádná elektroaktivní komponenta v eluentu, která by podléhala elektrochemické reakci [40, 42, 43].

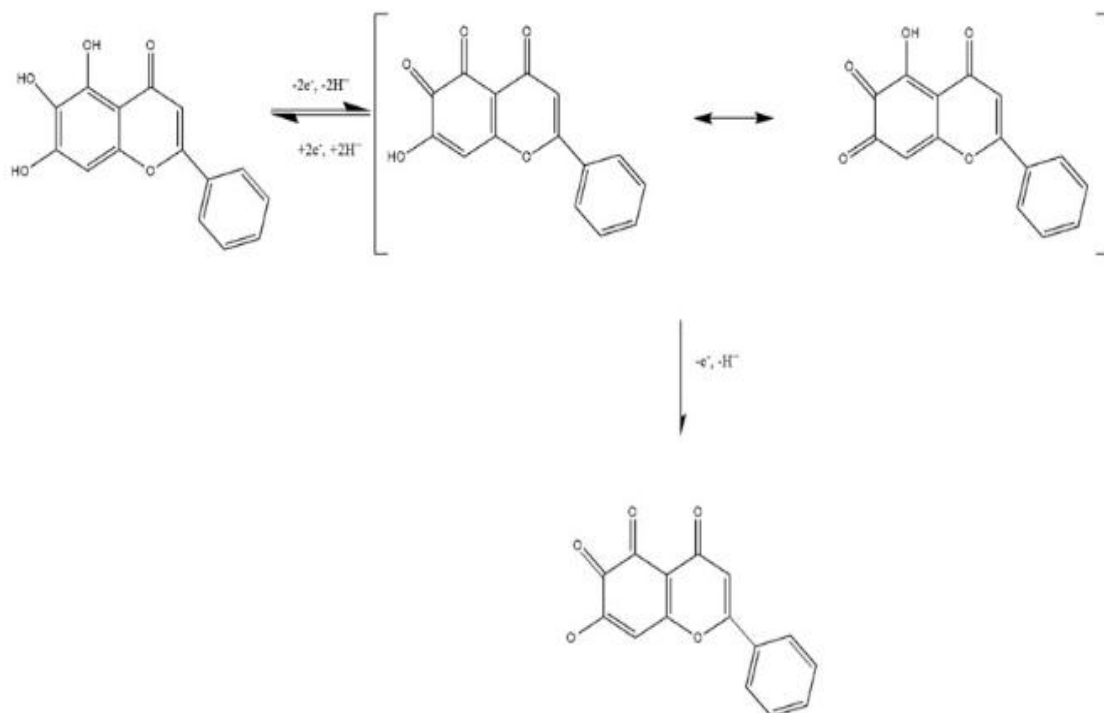
2.4. Analytické metody používané při analýze baicaleinu

Při analýze baicaleinu jsou zdaleka nejvyužívanější separační metody a to zejména HPLC ve spojení se spektrochemickou detekcí nebo elektrochemickou detekcí. Ovšem svoje místo při analýze baicaleinu má i voltametrie, jelikož je baicalein velmi dobře oxidovatelná látka, byl předmětem výzkumů mechanismus oxidace pomocí této metody.

2.4.1. Voltametrie

Voltametrie patří mezi metody, při níž je měřena závislost protékajícího elektrického proudu na vloženém napětí. Tato závislost se označuje jako voltametrická křivka, polarografická křivka nebo někdy také jako polarizační křivka. Používá se dvou nebo tříelektrodové zapojení[43].

V publikované práci [45] se baicalein stanovoval pomocí diamantové elektrody dopované borem. Baicalein v roztoku Britton-Robinsonova pufru poskytoval dva oxidační píky jeden při +0,5 a druhý při +0,8 V (vs. Ag/AgCl). Byl zvolen tříelektrodový systém skládající se z borem dopované diamantové elektrody, referentní Ag/AgCl elektrody a pomocné platinové elektrody. Jelikož pH elektrolytu ovlivňuje vlastnosti analyzovaného roztoku, tak bylo zkoumáno elektrochemické chování baicaleinu při různém pH. Nejlepší výsledky byly při pH 2, naopak při vyšších hodnotách pH docházelo k rozšiřování píků. Podle autorů dochází v prvním kroku oxidace baicaleinu k oxidaci dvou hydroxylových skupin a druhým krokem je oxidace třetí hydroxylové skupiny (Obr. 5).



Obr. 5 - mechanismus oxidace baicaleinu, kdy se oxidují tři hydroxylové skupiny [45]

Voltametrickým stanovením baicaleinu pomocí uhlíkové pastové elektrody, dopované mnohostěnnými uhlíkovými nanotrubicemi se zabývá [46]. Elektrochemický článek se skládal ze tří elektrod, jako pracovní elektroda byla použita karbonová nanotrubičková pastová elektroda (CNTPE), platinový drát byl použit jako pomocná elektroda a kalomelová elektroda jako referenční elektroda. Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním baicaleinu v ethanolu.

2.4.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Při analýze baicaleinu se ze separačních metod nejčastěji využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Plynová chromatografie se pro analýzu baicaleinu potažmo flavonoidů většinou nepoužívá, protože je nutné vzorky derivatizovat [47]. Velkou výhodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie je, že vzorky není nutné složitě upravovat. Jako detektor se při analýze vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií většinou používá UV detektor [46,47] nebo elektrochemický detektor [15].

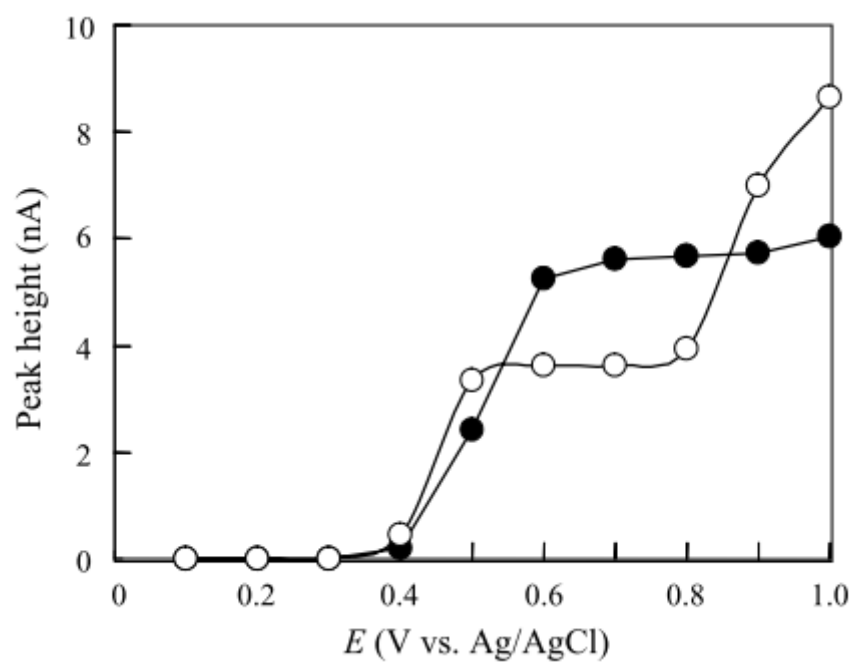
V práci se zabýval J. Gao a kol. [48] analýzou tinktur ze šišáku bajkalského a šišáku stranokvětého pomocí HPLC se spektrochemickou detekcí. Byla provedena analýza vzorových tinktur běžně prodávaných ve Velké Británii. Vzorky tinktur byly připraveny tak, že 50 μl tinktury bylo zředěno 950 μl methanolu. Výsledné vzorky byly centrifugovány při 13 000 min^{-1} po dobu 5 minut. Byla použita kolona Luna C18, 5 μm (150 x 4,6 mm i.d.). Detekce probíhala při 270 nm. Bylo zjištěno, že se jednotlivé tinktury liší obsahem účinných látek v závislosti na obsahu ethanolu. Přípravky s 45 % obsahem ethanolu obsahovaly 5krát více baicaleinu a 2krát více baicalinu než přípravky s 25 % procenty ethanolu.

L. Zhang a kol. [49] se zabýval vyvinutím jednoduché metody stanovení pro baicalinu a baicaleinu v plazmě za pomoci HPLC s UV detekcí. Jako vnitřní standard (IS) byl použit 6-Hydroxyflavon (6-HF). K chromatografickému oddělení baicaleinu, baicalinu a vnitřního standardu bylo dosaženo použitím kolony s reverzní fází (BDS- deaktivovaná silikátová fáze, 25 cm x 4,6 mm id; velikost částic 5 μm). Mobilní fáze se skládala ze směsi methanolu, acetonitrilu a 20 mM pufru dihydrogenfosforečnanu sodného (pH 4,6). Detekce byla prováděna při 320 nm. Zásobní roztoky baicaleinu a baicalinu (1 mg/ml) byly připraveny rozpuštěním příslušného množství vzorku v methanolu.

Elektrochemický detektor je vhodný pro analýzu baicaleinu, jak bylo uvedeno v kapitole 2.4.1, baicalein je velmi snadno oxidovatelný. Elektrochemická detekce je výhodná pro analýzu složitějších matric, přesto je důležité neopomenout optimalizovat podmínky separace.

Zkoumáním farmakinetika baicalinu a baicaleinu v krevní plazmě potkana pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí se zabýval A. Kotani a kolektiv [15]. Detekce byla prováděna s μ HPLC-ED s kolonou Capcell Pak C18 UG 120 microbore ODS (150 x 1 mm i.d., 3 μ m), termostatem a elektrochemickým detektorem. Elektrochemický článek byl zkonstruován ze skleněné uhlíkové pracovní elektrody, referentní argentchloridové elektrody a pomocné elektrody z nerezavějící oceli. Mobilní fáze byla složená z kyseliny fosforečné, methanolu a vody (0,5:60:40, v/v/v), průtok byl nastaven na 25 μ l/min. Detekční potenciál pro monitorování baicalinu a baicaleinu byl nastaven na +0,6 V (vs. Ag/AgCl). Pro stanovení koncentrací baicalinu a baicaleinu byla použita metoda vnitřního standardu a jako vnitřní standard byl použit diethylstilbestrol (I.S.).

Při elektrochemické reakci dochází k oxidaci u baicaleinu produkci orto-chinonu na A-kruhu. Pro stanovení optimálních detekčních potenciálů pro baicalin a baicalein byly sestrojeny hydrodynamické voltamogramy. Baicalin a baicalein se oxidovaly v potenciálech pozitivnějších než +0,4 V (vs. Ag/AgCl). V případě baicaleinu byly pozorovány dvě oxidační vlny v hydrodynamickém voltammogramu: jedna při +0,5 V a druhá při +0,9 V. Při potenciálech větších než +0,8V, byla senzitivita vyšší, ale reprodukovatelnost nižší, pravděpodobně kvůli kontaminaci povrchu elektrody. V studii byl tedy detekční potenciál nastaven na +0,6 V (vs. Ag/AgCl) (viz.Obr. 6).



baicalin (●) baicalein (○)

Obr. 6- hydrodynamický voltamogram[15]

3. Experimentální část

3.1. Instrumentální vybavení

HPLC systém se skládal z ESA isokratické pumpy (Model 582), (ESA Inc., Chelmsford, MA, USA) s tlumičem pulsů, manuálního dávkovače s 20 μ l smyčkou a ESA coulometrického detektoru III s dvouelektrodovou standardní analytickou celou (Model 5010A). Byla použita kolona C8 Gravity 5 μ m (250x2 mm i.d.). Pro vyhodnocení dat byl použit program Clarity (DataApex, Česká republika). Vzorky byly vpravovány do systému pomocí skleněné 25 μ l stříkačky (Hamilton, Reno, NV, USA).

3.2. Chemikálie

Acetonitril (HPLC-super gradient, VWR Chemicals, Francie), Methanol (HPLC-gradient grade, Fisher Scientific, UK), potravinářský ethanol (PENTA, Česká republika), dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, Česká republika), kyselina fosforečná (PENTA, Česká republika), hydroxid sodný (PENTA, Česká republika), baicalein (Sigma-Aldrich, USA), deionizovaná voda (Milipore, Francie), ultra čistá voda (Biosan)

3.2.1. Rostlinný materiál

- nařezaný a usušený kořen šišáku bajkalského (výrobce: Nanga, krajina původu: Čína)

3.2.2. Vzorky tinktur

- Šišák bajkalský, originální bylinné kapky (výrobce: Dr. Popov)
- Šišák bajkalský kořen - bylinná tinktura (výrobce: Bylinné kapky, s.r.o.)

3.2.3. Informace o tinkturách uváděné výrobcem

Šišák bajkalský, originální bylinné kapky, 50 ml

Výrobce: Dr. Popov

Údaje o výrobku uvedené na stránkách výrobce: Šišák bajkalský patří k velmi známým adaptogenům, což jsou rostliny, které udržují duševní a fyzickou rovnováhu našeho organismu a je tedy vhodné je užívat např. při únavě, vyčerpání či stresu. Šišák bajkalský se také podílí na zdravém stavu kloubů a svalů. Stačí 2-3x denně užívat 20 kapek

tinkтуры. Tinkтуру je možno nakapat i do nápoje, např. vody, čaje. Maximální doporučená denní dávka (60 kapek) obsahuje extrakt z 51 mg šišáku.

Složení: voda, jemný kvasný líh (alk. 30% obj.), šišák bajkalský kořen [50].

Šišák bajkalský kořen - bylinná tinktura 50 ml

Výrobce: Bylinné kapky, s.r.o.

Údaje o výrobku uvedené na stránkách výrobce: Šišák kořen (bylinná tinktura - Pavlovy kapky bylinné kapky). Přírodní bylinný extrakt z kořene léčivé rostliny šišáku bajkalského. Dávkování: 3x denně 20 kapek. Z důvodu obsahu alkoholu nevhodné pro děti, těhotné a kojící ženy.

Omezení užívání: Při léčbě hypotenze (šišák výrazně snižuje krevní tlak), nekombinovat s pivoňkou.

Složení tinkтуры: velejemný melasový ethanol 40%, léčivá rostlina šišák bajkalský [51].

3.3. Pracovní postup

3.3.1. Zpracování a příprava vzorků

Příprava vlastní tinkтуры

Bylo naváženo 10 g nasekaného kořene šišáku bajkalského, který byl dán do reagenční lahve s polypropylenovým uzávěrem, poté bylo přidáno 50 ml 50% potravinářského ethanolu. Takto připravený vzorek byl po dobu 12 týdnů za občasného protřepání uložen na tmavém místě. Po uplynutí 12 týdnů byl roztok dekantován, zbavil se tak velkých kousků kořenů a potom byl roztok ještě protlačen přes diskový filtr.

Příprava vzorků tinktur pro kvantifikaci metodou přidavku standardu

Vzorky tinktur byly nejprve centrifugovány při 10 000 otáčkách po dobu 5 minut. Poté bylo do jednotlivých eppendorfek odpipetováno 50 μ l tinkтуры od výrobce Dr. Popov, 10 μ l tinkтуры od výrobce Bylinné kapky, s.r.o. a 10 μ l vlastní tinkтуры. Jednotlivé vzorky tinktur byly následně naředěny na 1 ml methanolem. Vzorek vlastní tinkтуры byl ještě navíc ředěn tak, že bylo odebráno 400 μ l vzorku a k němu bylo přidáno 600 μ l mobilní fáze.

Příprava vzorků tinktur pro kvantifikaci metodou vnějšího standardu

Vzorky tinktur byly nejprve centrifugovány jako u předešlého postupu, poté bylo od všech vzorků odpipetováno 10 μ l ze supernatantu a zředěno 990 μ l methanolu. Vzorek vlastní tinktury byl ještě naředěn tak, že bylo odebráno 100 μ l 100krát zředěného vzorku a k němu bylo přidáno 400 μ l mobilní fáze.

3.3.2. Příprava standardu

Do skleněné vialky bylo odváženo 2,38 mg standardu baicaleinu a k němu bylo přidáno 1,5 ml methanolu. Dále bylo do skleněné vialky odebráno 100 μ l roztoku standardu a zředěno 1,4 ml methanolu (výsledná $c=0,106$ mg/ml). Pro kvantifikaci vzorků metodou přídavku standardu byl připraven standard odpipetováním 240 μ l standardu, k němu bylo přidáno 260 μ l mobilní fáze (výsledná $c=0,05088$ mg/ml). Pro kvantifikaci vzorků metodou vnějšího standardu byl připraven standard odpipetováním 20 μ l standardu baicaleinu ($c=0,05088$ mg/ml), dále bylo přidáno 180 μ l mobilní fáze (výsledná $c=0,005088$ mg/ml). Pro sestavení hydrodynamického voltamogramu byl připraven standard z 50 μ l standardu baicalenu ($c=0,106$ mg/ml) a 450 μ l methanolu (výsledná $c=0,0106$ mg/ml).

3.3.3. Příprava mobilní fáze

Pufr byl připraven přesným navážením odpovídajícího množství NaH_2PO_4 a rozpuštěním v ultra čisté vodě. Takto připravený pufr byl následně vakuově přefiltrován na filtru o porozitě 0,2 μ m, pH bylo upraveno H_3PO_4 (u pufrů s pH=2, 3, 4) a $\ominus$ NaOH (pro pH=5) na požadovanou hodnotu a doplněno po rysku. Jako optimální složení mobilní fáze byla zvolena směs acetonitril (ACN):pufr (pH=4) (40:60, v/v).

3.3.4. Metody použité při kvantifikaci baicaleinu

Ke kvantifikaci vzorků tinktur byla zvolena metoda standardního přídavku. Tato metoda je výhodná pro analýzu složitých matric, máte-li k dispozici čistý standard. Metoda standardního přídavku je založena na provedení dvou a více analýz. První je analýza samotného vzorku a poté se analyzuje vzorek, ke kterému bylo přidáno známé množství

stejně látky, kterou stanovujeme. Tato metoda se vyznačuje vysokou spolehlivostí, jelikož standard přidáváme přímo ke vzorku, a tudíž analyt i standard reagují za totožných podmínek. Bylo nutné zvolit koncentraci standardu baicaleinu, aby se plocha píku po prvním přidavku zvětšila aspoň o 20 %, jako ideální jevila koncentrace standardu baicaleinu 0,05088 mg/ml.

Tabulka I - systém přípravy při kvantifikaci

	vzorek tinktury	mobilní fáze	standard
0. přidavek	160 µl	40 µl	0 µl
1. přidavek	160 µl	20 µl	20 µl
2. přidavek	160 µl	0 µl	40 µl

Při stanovení baicaleinu metodou standardního přidavku se použilo vyhodnocení pomocí extrapolace přímky zpět na průnik osou x. Jelikož na osu x je vynášen objem přidávaného standardu, tak hodnota průniku osou x se rovná množství standardu. Dále je počítáno podle vzorce: $V_{vzorek} \cdot c_{vzorek} = V_{standard} \cdot c_{standard}$.

Pro srovnání bylo provedeno vyhodnocení pomocí metody vnějšího standardu. Metoda vnější standardu patří mezi jednodušší metody kvantitativní analýzy. Výhoda je, že se mohou provést dva nástríky, a to nástrík samotného vzorku a roztoku standardu o známé koncentraci. Vyhodnocení množství analytu ve vzorku se provádí pomocí trojčlenky. Tato metoda není vhodná pro vzorky, kde důležitou roli hraje matrice, jelikož standard nereaguje za identických podmínek jako analyt.

Koncentrace baicaleinu metodou vnějšího standardu byla vypočítána podle vzorce:

$$c(i) = \frac{A(i) \cdot c(s)}{A(s)}$$

kde c(i) je stanovovaná koncentrace baicaleinu ve vzorku, A(i) je plocha signálu baicaleinu ve vzorku, A(s) je plocha standardu získána proměřením standardu o známé koncentraci c(s).

3.4. Experimentální podmínky

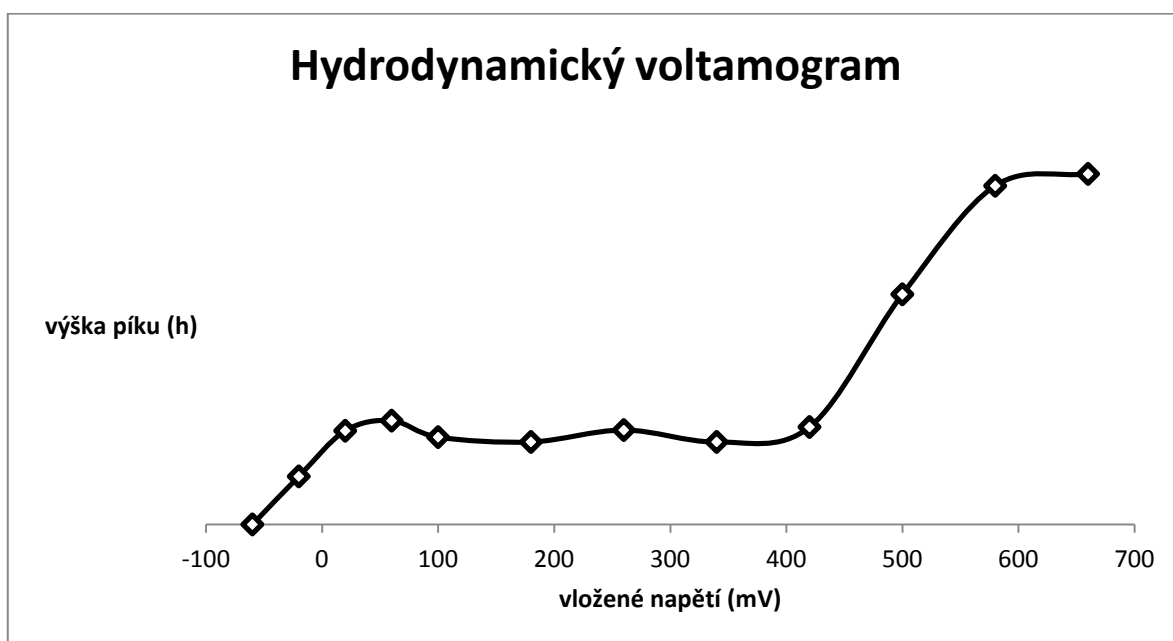
Pro HPLC byly zvoleny následující podmínky: mobilní fáze ACN:pufr (40:60, v/v) o pH=4, průtok mobilní fáze 0,2 $\mu\text{l}/\text{min}$, tlak systému se držel stabilně na 99 Bar, nástřik 5 μl (prováděn manuálně).

Detekční podmínky byly zvoleny následující: detekční potenciál na prvním kanále byl 20 mV a na druhém 500 mV (vs. Pd/H₂), citlivost (proudový rozsah) byl 5 $\mu\text{A}/\text{V}$ pro oba kanály.

4. Výsledky a diskuse

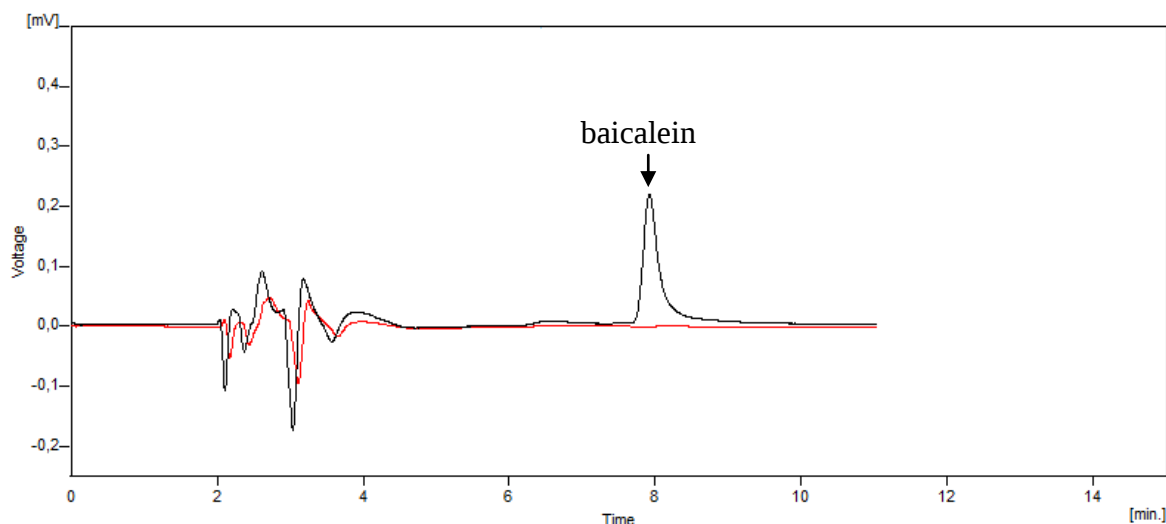
4.1. Hydrodynamický voltamogram

Pro testování hydrodynamického voltamogramu baicaleinu byl zvolen roztok standardu o koncentraci 0,0106 mg/ml. Byla měřena závislost výšky píku baicaleinu na velikosti vloženého napětí na pracovní elektrodě. Měření probíhalo v mobilní fázi o složení ACN:fosfátový pufr (40:60, v/v). Jako počáteční napětí bylo zvoleno - 60 mV (vs. Pd/H₂), dále se hodnoty napětí navyšovaly o 40 mV do hodnoty 100 mV, a pak se napětí navyšovalo o 80 mV až do hodnoty 660 mV (vs. Pd/H₂).



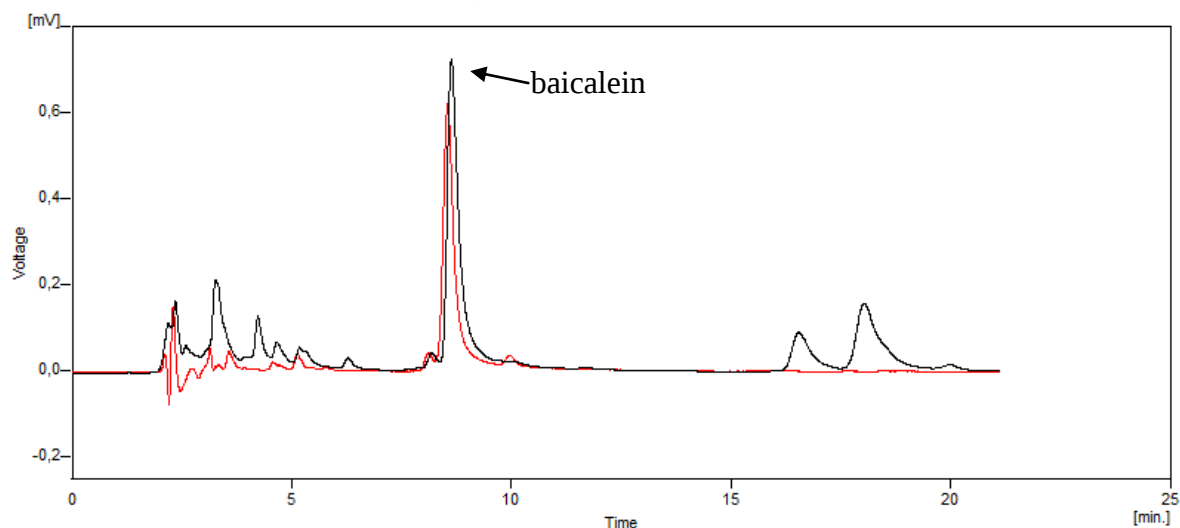
Obr. 7 - hydrodynamický voltamogram

Na Obr. 7 vidíme, že největší proudové odezvy je dosaženo při napětí 600-700 mV (vs. Pd/H₂), ovšem při takto velkém napětí dochází ke snížení selektivity reakce. Pro další experimenty bylo zvoleno napětí 20 mV (vs. Pd/H₂). Podobně jak je uvedeno v práci [15], můžeme pozorovat dvě oxidační vlny baicaleinu, přičemž zřejmě v první vlně dochází k oxidaci dvou hydroxylových skupin a ve druhé vlně dochází k oxidaci třetí hydroxylové skupiny (viz. Obr. 5 str. 26).



Obr. 8 - chromatogram standardu baicaleinu, kde na první elektrodě (černá barva) je napětí 20 mV (vs. Pd/H₂) a na druhé elektrodě (červená barva) je napětí 120 mV (vs. Pd/H₂)

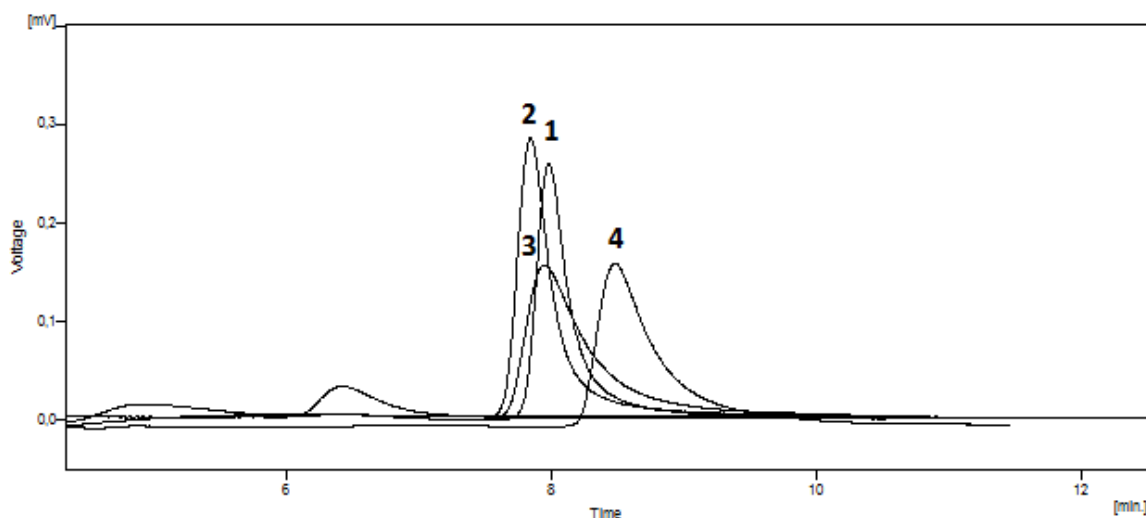
Obr. 8 ukazuje, že při 20 mV (vs. Pd/H₂) dochází ke kvantitativní oxidaci baicaleinu, tudíž nedochází na druhé elektrodě k žádné další oxidaci. Při výběru vhodného napětí vkládaného na elektrodu byla zohledněna selektivita při daném napětí, a taktéž množství zoxidovaného baicaleinu.



Obr. 9 - chromatogram vzorku tinktury při dvou různých potenciálech, kde na prvním elektrodě (červená barva) bylo vloženo napětí 20 mV (vs. Pd/H₂) a na druhé elektrodě (černá barva) bylo vloženo napětí 500 mV (vs. Pd/H₂).

Z Obr. 9 je evidentní, že vyšší selektivita je dosažena při napětí 20 mV (vs. Pd/H₂). Při napětí 500 mV je odezva signálu baicaleinu větší, ale současně dochází k detekci i jiných komponent s vyššími oxidačními potenciály.

4.2. Vliv pH pufru

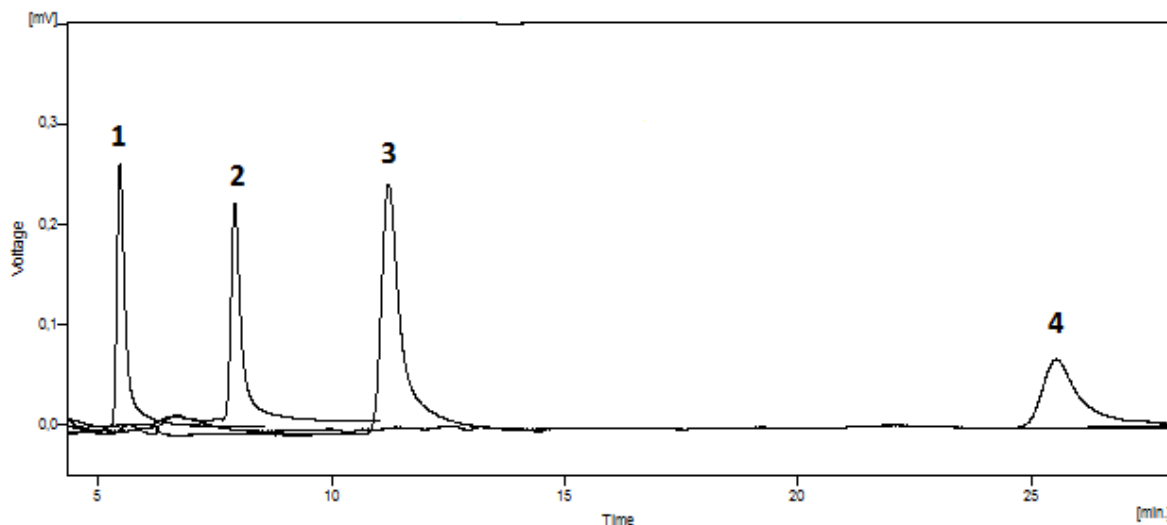


Obr. 10-chromatogram standardu baicaleinu při pH 2-5, vložené napětí je 20 mV (vs. Pd/H₂)

Píky: 1-baicalin při pH=5, 2-baicalen při pH=4, 3-baicalin při pH=3, 4-baicalin při pH=2

Obr. 10 demonstruje vliv pH pufru na výšku, plochu a tvar píku. Výsledný a zde zobrazený chromatogram byl vytvořen sloučením čtyř chromatogramů standardu baicaleinu při různém pH. Jasně zde vidíme, že při pH= 4 je odezva detektoru nejvyšší. Zatímco při snižování nebo zvyšování pH dochází ke snížení odezvy signálu a u pH= 2 dochází ke změně retenčního času.

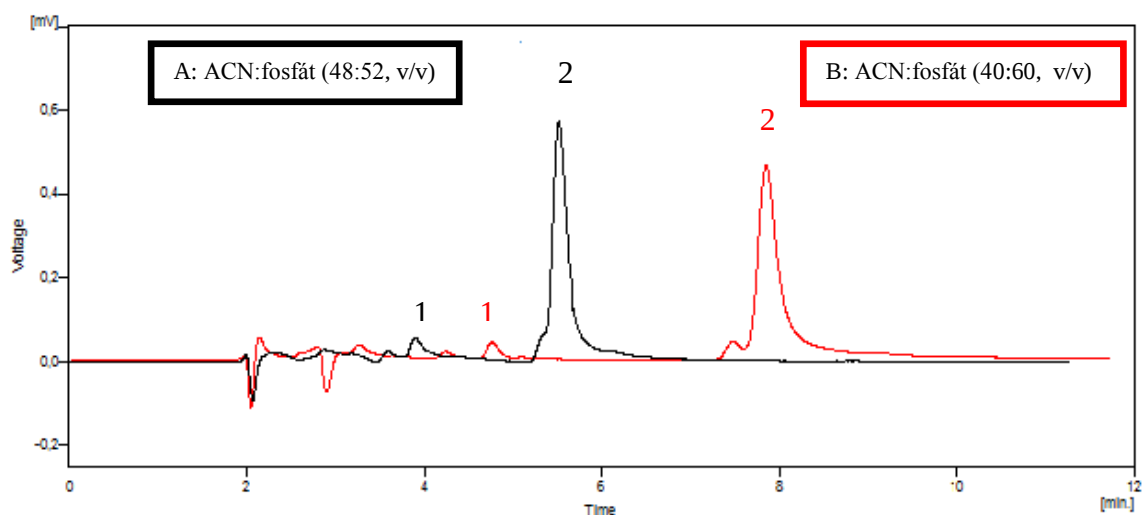
4.3. Vliv složení mobilní fáze



Obr. 11 - chromatogram standardu baicaleinu při různém složení mobilní fáze

Píky: 1-ACN:fosfátový pufr (48:52, v/v), 2-ACN:fosfátový pufr (40:60, v/v), 3-methanol:fosfátový pufr (60:40, v/v), 4-methanol:fosfátový pufr (50:50, v/v)

Na Obr. 11 lze vidět vliv složení mobilní fáze na tvar píku a na retenčním čase. Mobilní fáze methanol:pufr poskytovala širší a méně symetrické píky. Zatímco při použití mobilní fáze ACN:pufr byly píky užší a více symetrické. Při optimalizaci mobilní fáze byla menší selektivita při složení ACN:pufr (48:52, v/v) než při složení ACN:pufr (40:60, v/v). V případě analýzy tinktur, kde je přítomno více látek, je výhodnější mít lepší selektivitu. Dalším krokem určení množství ACN v mobilní fázi je vliv na retenci a rozlišení píků (viz. Obr. 12)



Obr. 12- separace vzorku tinktury při různém poměru ACN:fosfátový pufr a napětí 20 mV (vs. Pd/H₂)

Píky: 1 - neznámá látka, 2 - baicalein

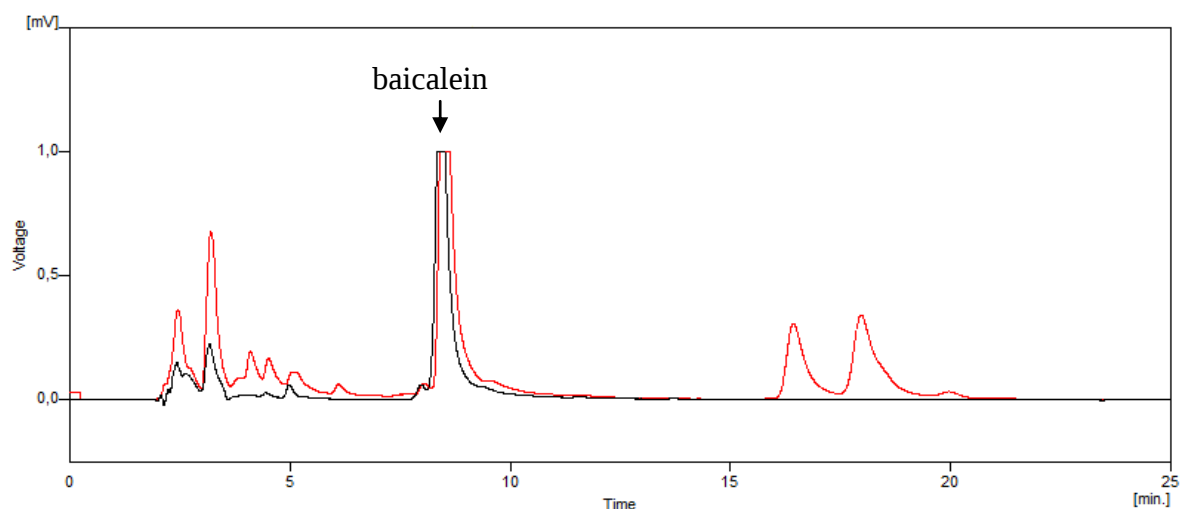
Na Obr. 12 lze vidět, že při použití mobilní fáze A je retence i rozlišení píků nižší než při použití mobilní fáze B. Při použití mobilní fáze B dochází k lepší separaci mezi píky 1 a 2, než při použití mobilní fáze A. Taktéž lze na obrázku vidět, že na začátku píku baicaleinu je přítomen malý signál neznámé látky, který je lépe separován při použití menšího množství organického modifikátoru.

Tabulka II- vliv složení mobilní fáze na faktor selektivity při analýze vzorku tinktury

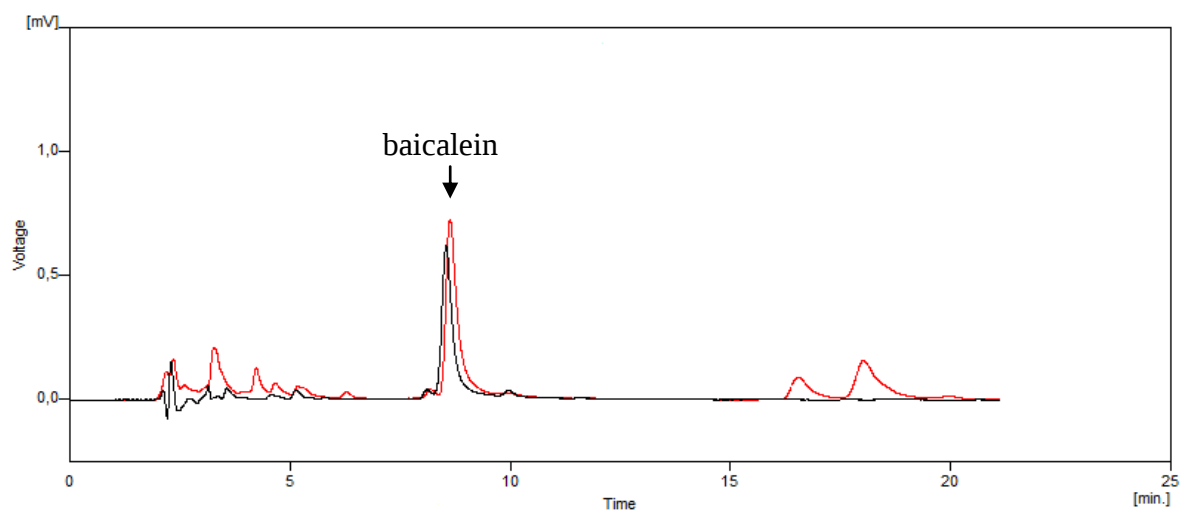
mobilní fáze	t_R - neznámá látka (min)	t_R -baicalein (min)	t_M -mrtvý čas (min)	α -faktor selektivity
acetonitril:fosfátový pufr (48:52 v/v)	3,897	5,510	1,992	1,85
acetonitril:fosfátový pufr (40:60 v/v)	4,757	7,857	1,992	2,12

4.4. Analýza vzorků tinktur

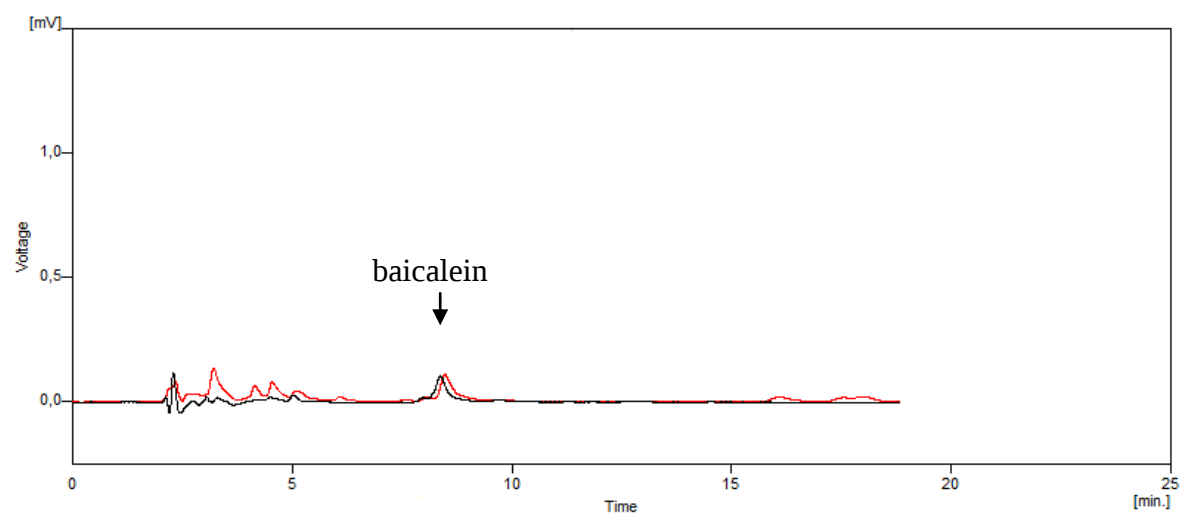
Pro přibližné srovnání těchto tří tinktur byl zvolen stejný postup ředění pro všechny tři vzorky. Při analýze vzorků tinktur se látky dostatečně od sebe separovaly. Z Obr. 13-15 lze vidět, že jednotlivé chromatogramy jsou si podobné, co do obsahu přítomných látek v tinktuře. Z toho lze usoudit, že jednotlivé tinktury byly pravděpodobně připraveny ze stejného materiálu (kořen šišáku) a podobným způsobem jaký byl zvolen při přípravě vlastní tinktury. I když mají jednotlivé vzorky podobný fingerprint, liší se v množství účinných látek.



Obr. 13 - chromatogram vzorku vlastnoručně připravené tinktury



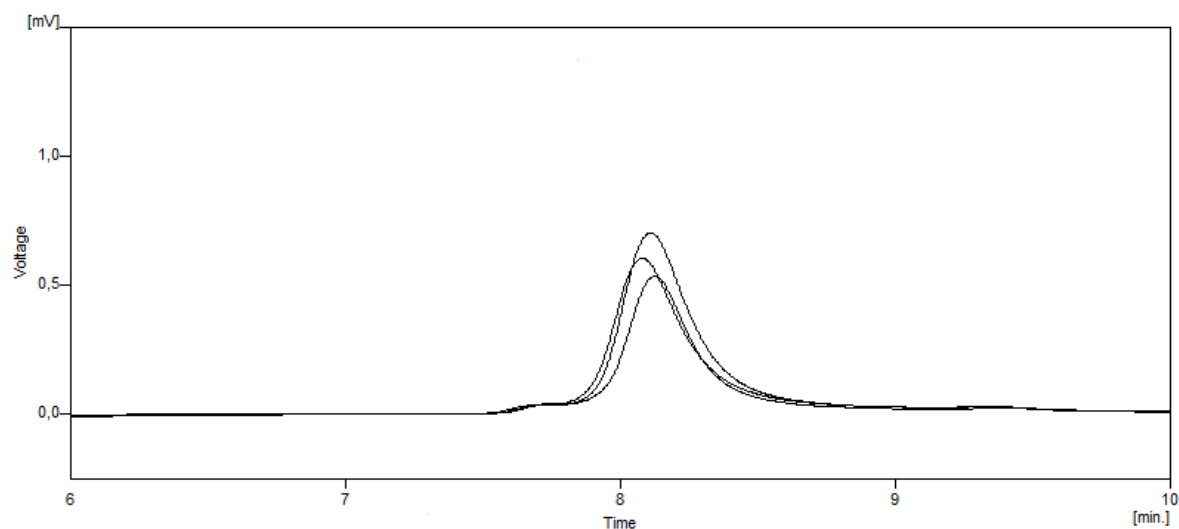
Obr. 14 - chromatogram vzorku tinktury Bylinné kapky, s.r.o.



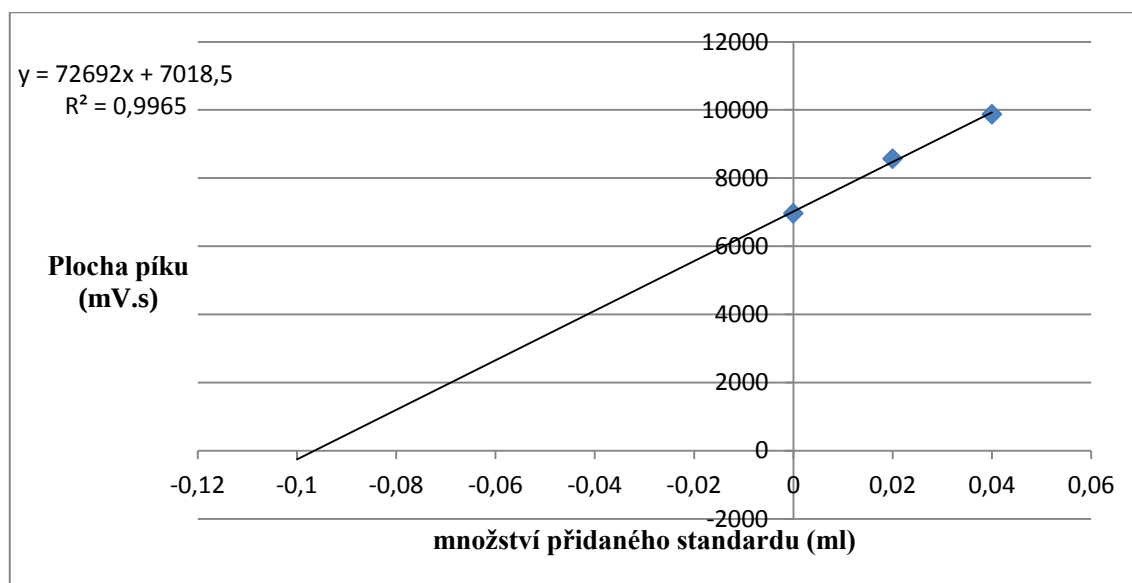
Obr. 15 - chromatogram vzorku tinktury Popov

4.5. Kvantifikace vzorků tinktur

Vzorek tinktury Bylinné kapky, s.r.o.



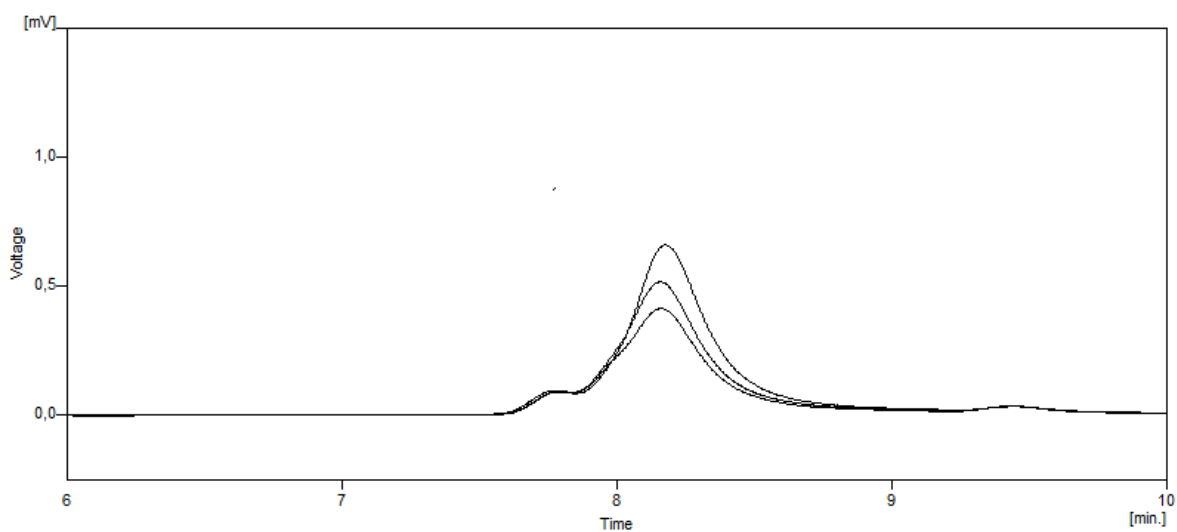
Obr. 16 - analýza vzorku tinktury Bylinné kapky, s.r.o. se všemi přísadami, zobrazena je první elektroda s napětím 20 mV (vs. Pd/H₂)



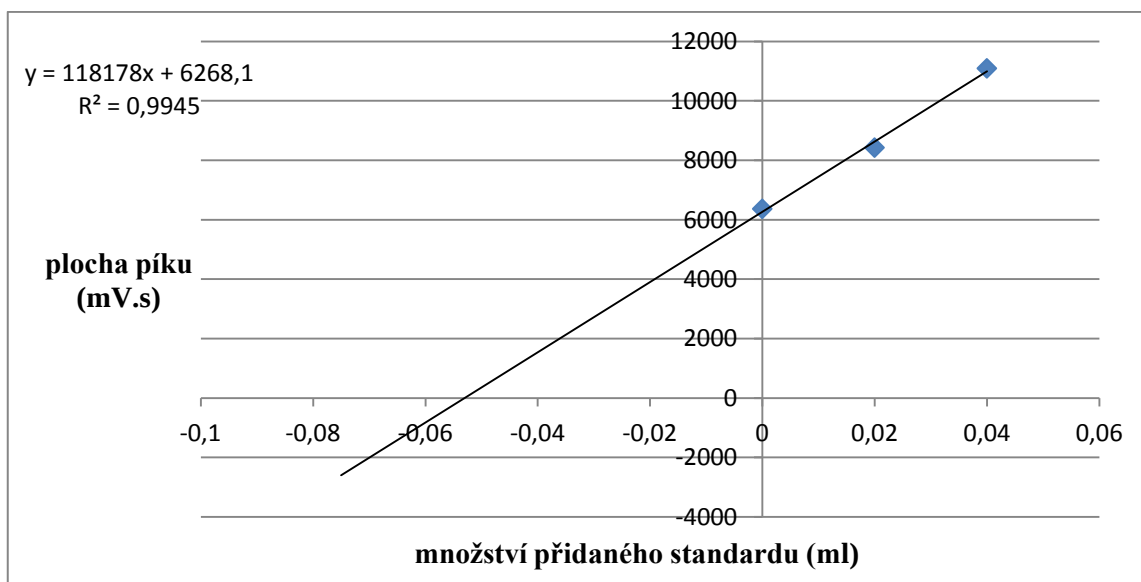
jsou uvedeny průměrné hodnoty $n=3$

Obr. 17 - graf přídatků standardu pro vzorek tinktury Bylinné kapky, s.r.o.

Vzorek tinktury Popov



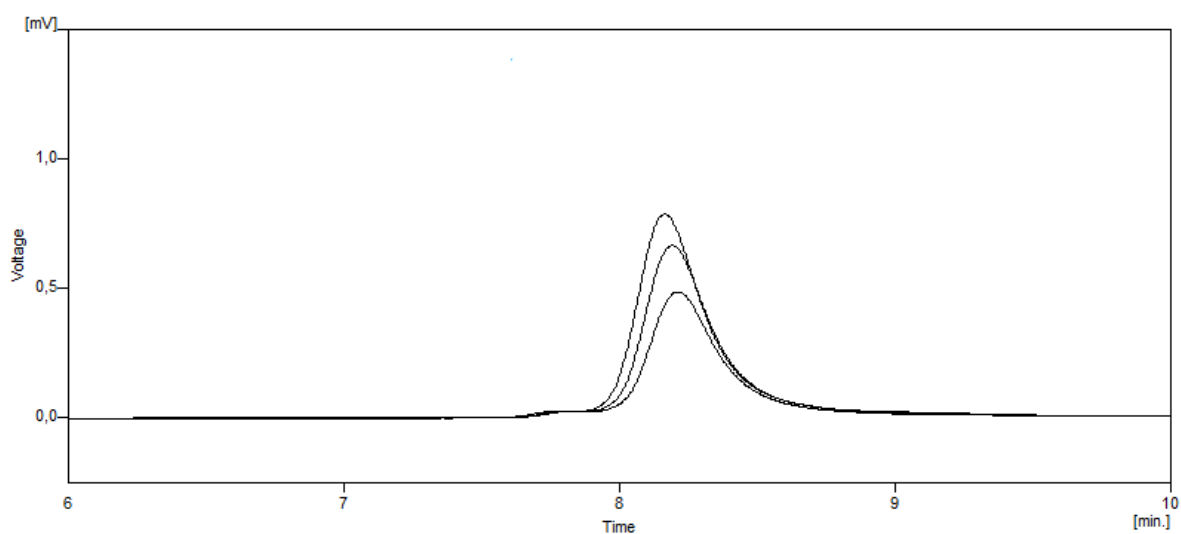
Obr. 18 - analýza vzorku tinktury Popov se všemi přísadkami, zobrazena je první elektroda s napětím 20 mV (vs. Pd/H₂)



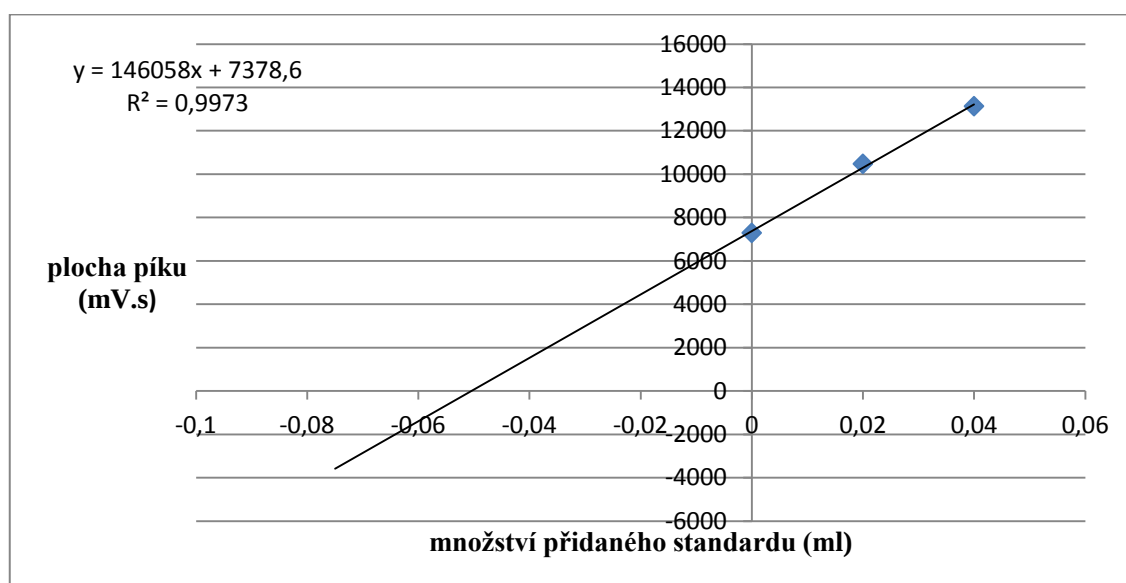
jsou uvedeny průměrné hodnoty $n=3$

Obr. 19 - graf přídavek standardu pro vzorek tinktury Popov

Vlastní vzorek tinktury



Obr. 20 - analýza vlastního vzorku tinktury se všemi přísadkami, zobrazena je první elektroda s napětím 20 mV (vs. Pd/H₂)



jsou uvedeny průměrné hodnoty $n=3$

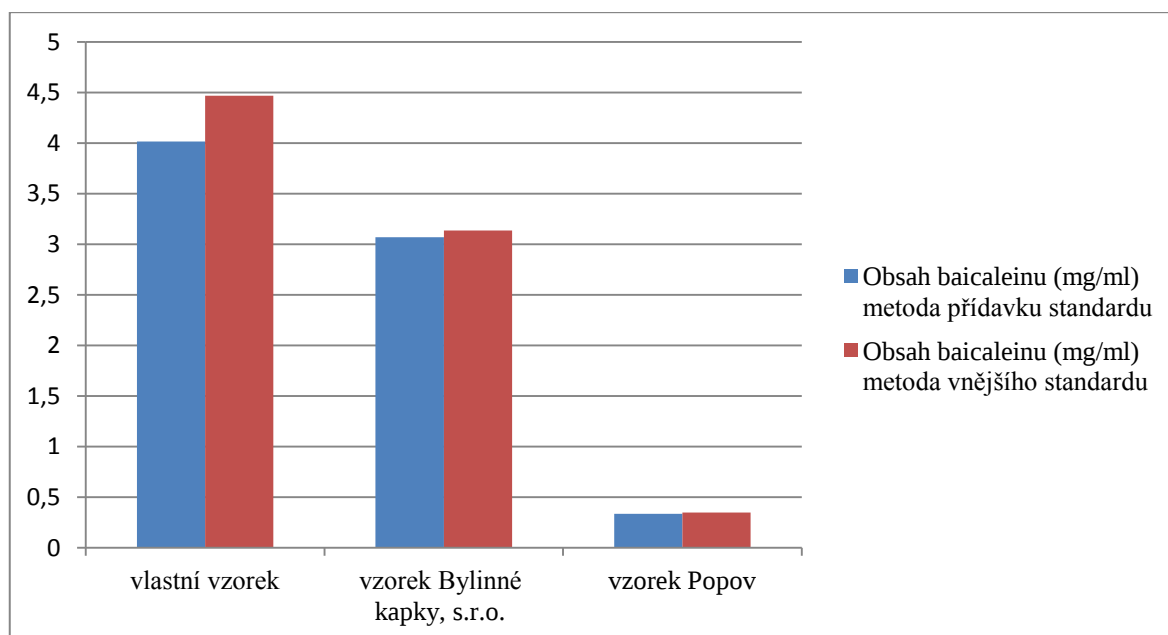
Obr. 21 - graf přidavků standardu pro vlastní vzorek tinktury

4.5.1. Shrnutí výsledků

Tabulka III - název vzorku, hodnoty koncentrací baicaleinu vypočtené metodou přidavků standardu a metodou vnějšího standardu, směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky (RSD)

Obsah baicaleinu (mg/ml)			směrodatná odchylka	RSD
vzorek tinktury	metoda standardního přidavku	metoda vnějšího standardu		
vlastní vzorek	4,016	4,467	0,2255	5,32%
vzorek Bylinné kapky, s.r.o.	3,070	3,135	0,0325	1,05%
vzorek Popov	0,337	0,348	0,0055	1,61%

jsou uvedeny průměrné hodnoty n=3



Obr. 22 - graf zobrazující množství baicaleinu v jednotlivých vzorcích tinktur

Na Obr. 22 lze, taktéž vidět srovnání dvou metod kvantifikace baicaleinu ve vzorcích tinktur, a to metody standardního přidavku a metody vnějšího standardu. Dle očekávání se nalezený obsah baicaleinu zjištěný oběma metodami nejvíce liší u nejkonzentrovanejšího extraktu (vlastní tinktura), kde lze i předpokládat nejsilnější vliv matrice. Nicméně zjištěné hodnoty RSD ukazují, že obě metody poskytují prakticky velmi podobná data. Přestože

metoda standardního přídavku je obvykle preferována pro analýzu složitějších matric (je-li k dispozici standard identický s analytem), vzhledem k její výrazně větší časové a ekonomické náročnosti lze konstatovat, že pro tento typ vzorků je rovněž i metoda vnějšího standardu dobře použitelnou kvantifikační metodou.

Při analýze bylo zjištěno, že jednotlivé tinktury obsahují různé množství baicaleinu a dalších látek obsažených v kořenu baicaleinu. Už z Obr. 22 je vidět, že jeden ze vzorků komerčních tinktur obsahuje minimální množství baicaleinu oproti druhému komerčnímu vzorku. Největší množství baicaleinu je přítomno ve vlastním vzorku tinktury, která byla připravena tradiční metodou pomocí macerace. Potvrdila se hypotéza z práce Gao a kol. [48], že tinktura s vyšším obsahem alkoholu obsahuje více baicaleinu.

Při srovnávání vlastní tinktury s komerčními preparáty je důležité vyzdvihnout fakt, že příprava vlastní tinktury je pracnější i časově náročnější, ale zpravidla bude poskytovat lepší produkt. V neposlední řadě může být i příprava vlastní tinktury levnější než komerční tinktury.

5. Závěr

Cílem této práce bylo podat širší informace o méně známé rostlině šišáku bajkalském, ale široce využívané v tradičních medicínách a navrhnout vhodný postup ke stanovení baicaleinu v tinkturách pomocí HPLC s coulometrickým detektorem. Elektrochemický detektor je svou selektivitou vhodný pro analýzu vzorků podobného typu. Experimentálně bylo potvrzeno, že baicalein se oxiduje již při nízkých potenciálech. Postupnou optimalizací podmínek separace (od složení mobilní fáze s optimálním pH, až po vhodný detekční potenciál) byla navržena metoda kvantifikace baicaleinu v ethanolických extraktech kořene šišáku bajkalského.

Ke kvantifikaci baicaleinu v reálných vzorcích byly použity dvě metody. A to metoda standardního přídavku, která je vhodná pro analýzu složitějších matric, a také metoda vnějšího standardu.

Z analýz vyplynulo, že jednotlivé látky se neliší spektrem obsažených látek, ale obsahem účinných látek. Výrazně nejvyšší obsah baicaleinu je přítomen ve vlastní tinktuře, rovněž tinktura Bylinné kapky s.r.o. obsahuje velké množství baicaleinu, zatímco v tinktuře Dr. Popov bylo přítomno malé množství této účinné látky. Z výše uvedeného vyplývá, že dražší preparát je kvalitnější, avšak ideální variantou je domácí příprava tinktury. V takovém případě je nutné zařídit si kvalitní suroviny pro přípravu tinktury.

6. Použitá literatura:

- [1] N. Cook, Flavonoids?Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, J. Eur. Ceram. Soc. 7 (1996) 66–76.
- [2] P.-G. Pietta, Flavonoids as Antioxidants, J. Nat. Prod. 63 (2000) 1035–1042.
- [3] S. V. Jovanovic, S. Steenken, M. Tasic, B. Marjanovic, M. G. Simic, Flavonoids as antioxidants, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 4846–4851.
- [4] E.-R. Lee, G.-H. Kang, S.-G. Cho, Effect of Flavonoids on Human Health: Old Subjects but New Challenges, Recent Pat. Biotechnol. 1 (2007) 139–150.
- [5] D. Atmani, N. Chaher, D. Atmani, M. Berboucha, N. Debbache, H. Boudaoud, Flavonoids in Human Health: From Structure to Biological Activity, Curr. Nutr. Food Sci. 5 (2009) 225–237.
- [6] <https://www.pinterest.cl/pin/96405248258783814/>, staženo 23. dubna 2020.
- [7] P. Valíček, Rostliny pro zdravý život, START, Benešov, 2014.
- [8] J. Janča, J. A. Zentrich, Herbář léčivých rostlin, 4. díl, EMINENT, Praha, 1996.
- [9] L. Dvořáková, Obsah flavonoidů v komerčně dostupných přípravcích s obsahem šíšáku bajkalského, , Univerzita Karlova v Praze, 2010.
- [10] Q. Zhao, X. Y. Chen, C. Martin, Scutellaria baicalensis, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants, Sci. Bull. 61 (2016) 1391–1398.
- [11] B. P. Gaire, S. K. Moon, H. Kim, Scutellaria baicalensis in stroke management: nature's blessing in traditional Eastern medicine, Chin. J. Integr. Med. 20 (2014) 712–720.
- [12] C. Zhang-fu, J. De-xian, J. Bare, Chinese materia medica, People's Medical Publishing House, Beijing, 2014.
- [13] N. Joshee, T. S. Patrick, R. S. Mentreddy, A. K. Yadav, Skullcap : Potential Medicinal Crop, Trends new Crop. new uses (2002) 580–586.
- [14] H. Maegawa, T. Nakamura, K. Saito, Regulation of traditional herbal medicinal products in Japan, J. Ethnopharmacol. 158 (2014) 511–515.

- [15] A. Kotani, S. Kojima, H. Hakamata, F. Kusu, HPLC with electrochemical detection to examine the pharmacokinetics of baicalin and baicalein in rat plasma after oral administration of a Kampo medicine, *Anal. Biochem.* 350 (2006) 99–104.
- [16] C. Li, G. Lin, Z. Zuo, Pharmacological effects and pharmacokinetics properties of *Radix Scutellariae* and its bioactive flavones, *Biopharm. Drug Dispos.* 32 (2011) 427–445.
- [17] Y. Y. Zhang et al., Four flavonoids from *Scutellaria baicalensis*, *Phytochemistry* 35 (1994) 511–514.
- [18] K. Ishimaru, K. Nishikawa, T. Omoto, I. Asai, K. Yoshihira, K. Shimomura, Two flavone 2'-glucosides from *Scutellaria baicalensis*, *Phytochemistry* 40 (1995) 279–281.
- [19] X. Shang et al., The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review, *J. Ethnopharmacol.* 128 (2010) 279–313.
- [20] S. Ikemoto et al., Antitumor effects of *Scutellariae radix* and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines, *Urology* 55 (2000) 951–955.
- [21] J. Feng, J. Leone, S. Schweig, Y. Zhang, Evaluation of Natural and Botanical Medicines for Activity Against Growing and Non-growing Forms of *B. burgdorferi*, *Front. Med.* 7 (2020) 6.
- [22] I. Wakabayashi, Inhibitory effects of baicalein and wogonin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages, *Pharmacol. Toxicol.* 84 (1999) 288–291.
- [23] B. Dinda, S. Dinda, S. DasSharma, R. Banik, A. Chakraborty, M. Dinda, Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders, , *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2017.
- [24] W.-J. Yan, Xi.-C. Ma, X.-Y. Gao, X.-H. XUE, S.-Q. Zhang, Latest research progress in the correlation between baicalein and breast cancer invasion and metastasis, *Mol. Clin. Oncol.* 4 (2016) 472–476.

- [25] P. Sithisarn, M. Michaelis, M. Schubert-Zsilavecz, J. Cinatl, Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells, *Antiviral Res.* 97 (2013) 41–48.
- [26] S. H. Buhner, 1 HERBAL TREATMENT FOR CORONAVIRUS INFECTIONS Stephen Harrod Buhner, , (2020) .
- [27] P. Rasmussen, Antiviral herbal approaches, *Phytomed Med. Herbs* (2020) .
- [28] Y. Yang, M. S. Islam, J. Wang, Y. Li, X. Chen, Traditional Chinese Medicine in the Treatment of Patients Infected with 2019-New Coronavirus (SARS-CoV-2): A Review and Perspective, *Int. J. Biol. Sci.* 16 (2020) 1708–1717.
- [29] H. Chen, Q. Du, Potential natural compounds for preventing SARS-CoV-2 (2019-nCoV) infection, *Preprints* (2020) .
- [30] L. Hui et al., The Fascinating Effects of Baicalein on Cancer : A Review, *Mol. Sci.* 17 (2016) 1–18.
- [31] M. Li-Weber, New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin, *Cancer Treat. Rev.* 35 (2009) 57–68.
- [32] X. Wu, Z. Haijun, M. J. Masoud, Salmani, R. Fu, B. Chen, Advances of wogonin , an extract from Scutellaria baicalensis , for the treatment of multiple tumors, *Onco Targets Ther.* 9 (2016) 2935–2943.
- [33] K. M. Hui et al., Anxiolytic effect of wogonin, a benzodiazepine receptor ligand isolated from Scutellaria baicalensis Georgi, *Biochem. Pharmacol.* 64 (2002) 1415–1424.
- [34] M. S. Y. Huen et al., 5,7-Dihydroxy-6-methoxyflavone, a benzodiazepine site ligand isolated from Scutellaria baicalensis Georgi, with selective antagonistic properties, *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 125–132.
- [35] H. G. Park et al., Anticonvulsant effect of wogonin isolated from Scutellaria baicalensis, *Eur. J. Pharmacol.* 574 (2007) 112–119.

- [36] D. Bensky, S. Clavey, E. Stöger, Chinese herbal medicine: materia medica, Eastland Press, Seattle, WA, 2004.
- [37] M. Yimam, Y. Zhao, W. Ma, Q. Jia, S. G. Do, J. H. Shin, 90-Day oral toxicity study of UP446, a combination of defined extracts of *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu*, in rats, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 1202–1209.
- [38] B. K. Puri, N. White, J. A. Monro, The effect of supplementation with *Scutellaria baicalensis* on hepatic function, *Med. Hypotheses* 133 (2019) .
- [39] N. Chalasani, Acute Liver Injury due to Flavocoxid (Limbrel), a Medical Food for Osteoarthritis, *Ann. Intern. Med.* 156 (2012) 857.
- [40] J. Churáček, Analytická separace látek, Státní nakladatelství technické literatury, Praha, 1990.
- [41] P. Jandera, J. Churáček, Gradient Elution in Column Liquid Chromatography: Theory and practise, Elsevier Science, Amsterdam, 1985.
- [42] L. Nováková, M. Douša, Moderní HPLC separace v teorii a praxi I., Lucie Nocáková (Hradec Králové), Michal Douša (Klatovy, Praha, 2013.
- [43] K. Záruba, Analytická chemie (1. díl), , 1.Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 2016.
- [44] <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>, staženo 24. března 2020 .
- [45] D. Kuzmanović, D. M. Stanković, D. Manojlović, K. Kalcher, G. Roglić, Baicalein - main active flavonoid from *Scutellaria baicalensis* - voltammetric sensing in human samples using boron doped diamond electrode, *Diam. Relat. Mater.* 58 (2015) 35–39.
- [46] J. Zhou, F. Wang, K. Zhang, G. Song, J. Liu, B. Ye, Electrochemical sensor for Baicalein using a carbon paste electrode doped with carbon nanotubes, *Microchim. Acta* 178 (2012) 179–186.
- [47] A. Magdechová, Možnosti identifikace flavonoidů v environmentálních matricích, , Vysoké učení technické v Brně, 2009.

- [48] J. Gao, A. Sanchez-Medina, B. A. Pendry, M. J. Hughes, G. P. Webb, O. Corcoran, Validation of a HPLC method for flavonoid biomarkers in skullcap (*Scutellaria*) and its use to illustrate wide variability in the quality of commercial tinctures, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 11 (2008) 77–87.
- [49] L. Zhang, G. Lin, Z. Zuo, High-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of baicalein and baicalein 7-glucuronide in rat plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 637–641.
- [50] <https://www.drpopov.cz/produkt/sisak-bajkalsky-50-ml-originalni-bylinne-kapky/>, staženo 1. března 2020 .
- [51] <https://www.tinktura.eu/cs/pavlovy-bylinne-kapky-tinktury-z-lecivych-rostlin-bylin/6-sisak-bajkalsky-koren-bylinne-ka>, staženo 1. března 2020 .
- [52] <https://www.gaiaherbs.com/products/hemp-herbs-relief>, staženo 1. března 2020 .

7. Obrazová příloha



Obr. 23 - tinktura od výrobce Dr. Popov (foto autor)



Obr. 24 - vlastní tinktura vyrobená macerací (foto autor)



Obr. 25 - tinktura od výrobce Bylinné kapky s. r. o. - Pavlovy kapky (foto autor)



Obr. 26 - květ šišáku bajkalského[52]



Obr. 27 - usušený kořen šišáku[16]