

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

Analýza elektroaktivních látek v třezalce tečkované (*Hypericum perforatum*)

Diplomová práce

Autor práce:

František Doktor

Studijní obor:

Analytická chemie

Forma studia:

Prezenční

Vedoucí diplomové práce

Doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.

Olomouc 2022

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 diplomové práce.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Janu Rozsypalovi za obrovskou pomoc při práci v laboratoři a nespočet velmi cenných rad,

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině a svým přátelům za trpělivost a podporu po celou dobu studia.

Bibliografické identifikace:

Jméno a příjmení autora:	František Doktor
Název práce:	Analýza elektroaktivních látek v třezalce tečkované (<i>Hypericum perforatum</i>)
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta UP
Vedoucí práce:	doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2022

Abstrakt:

Tato práce je zaměřena na analýzu hypericinu, látku ze skupiny naftodianthronů, vyskytující se především v třezalce tečkované (*Hypericum perforatum*) a příbuzných druzích.

Třezalka má velmi široké léčebné využití, které má v lidové medicíně tisíciletou historii. V dnešní době se přípravky z třezalky stále více využívají především k léčbě depresivních stavů a nespavosti, avšak velmi významné jsou rovněž účinky antibakteriální, antivirotické a antioxidační. V posledních letech se často skloňuje využití hypericinu při tzv. *fotodynamické terapii*, která se ukazuje nadějnou zejména při léčbě kožního melanomu.

V rámci této diplomové práce byla navržena jednoduchá isokratická metoda pro stanovení hypericinu v alkoholických tinkturách pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s elektrochemickým a spektrofotometrickým detektorem.

Tradičním postupem byl připraven ethanolický macerát z květů čerstvě nasbírané byliny. Tato tinktura byla, společně s dalšími komerčně dostupnými tinkturami, analyzována pomocí vyvinuté HPLC metody a následně byly všechny extrakty porovnávány z hlediska nalezeného obsahu hypericinu. Pro kvantifikaci byla zvolena metoda vnějšího standardu a kalibrační křivky.

Hypericin je látka s prokázanou citlivostí vůči světelnému záření. Čerstvý extrakt z květů byl vystaven účinkům slunečního světla a UV záření o vlnové délce 365 nm. Pomocí HPLC byly průběžně monitorovány přeměny hypericinu a dalších látek vlivem

expozice světlem. V obou případech byl pozorován nejprve nárůst obsahu hypericinu (pravděpodobně díky konverzi protoforem), při delší expozici však jeho obsah postupně klesá.

Klíčová slova: třezalka tečkovaná, hypericinu, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, tradiční medicína, elektrochemický detektor, spektrofotometrický detektor

Počet stran: 73

Počet příloh 0

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author:	Frantisek Doktor
Title:	Analysis of electroactive compounds in St. John's wort (<i>hypericum perforatum</i>)
Type of thesis:	Master
Department:	Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Czech Republic
Supervisor:	doc. RNDr. David Jirovsky, Ph. D.
The year of presentation:	2022

Abstract:

This work is focused on the analysis of hypericin, a compound from the naphthodithrone group, occurring mainly in St. John's wort (*Hypericum perforatum*) plant and related species.

St. John's wort has a very wide range of medicinal uses, which have a history of thousands of years in folk medicine. Nowadays, St. John's wort preparations are increasingly popular mainly to treat mild depression and insomnia, however, its antibacterial, antiviral and antioxidant effects are also important. In recent years, the use of hypericin in so-called *photodynamic therapy*, which is particularly promising in the treatment of cutaneous melanoma, has frequently been mentioned.

In the framework of this thesis, a simple isocratic method for the determination of hypericin in alcoholic tinctures was proposed using high-performance liquid chromatography (HPLC) in combination with electrochemical and/or spectrophotometric detector.

An ethanolic macerate was prepared from the flowers of a freshly collected herb by a traditional procedure. This tincture, along with other commercially available tinctures, was analyzed using the developed HPLC method and subsequently all extracts were compared for hypericin content. The external standard method with calibration curve was chosen for quantification.

Hypericin is a substance known to be sensitive to light radiation. The fresh flower extract was exposed to both sunlight and UV radiation (365 nm). The transformations

of hypericin and other substances due to light exposure were continuously monitored by HPLC. In both cases, an initial increase of hypericin was observed (probably due to proto-forms conversion), but with prolonged exposure its content gradually decreased.

Keywords: St. John's wort, hypericin, high-performance liquid chromatography, traditional medicine, electrochemic detection, spectrofotometric detection

Number of pages: 73

Number of appendices: 0

Language: Czech

Obsah

1 Úvod.....	10
2 Teoretická část	11
2.1 Čeleď Třezalkovité.....	11
2.2 Třezalka tečkovaná- <i>Hypericum perforatum</i>	15
2.2.1 Botanický popis.....	15
2.2.2 Význam v tradiční medicíně	16
2.2.3 Obsahové látky.....	18
2.2.4 Droga a její využití.....	22
2.3 Analytické metody použité při studiu třezalky tečkované a hypericinu	28
2.3.1 Spektrální metody	28
2.3.1 Plynová chromatografie	29
2.3.2 Kapilární elektroforéza	30
2.3.3 Kapalinová chromatografie.....	31
2.3.4 Elektrochemické metody.....	34
3 Experimentální část.....	35
3.1 Instrumentální vybavení.....	35
3.2 Chemikálie	35
3.3 Vzorčky tinktur	36
3.4 Pracovní postupy	36
3.5 Chromatografické podmínky	38
4 Výsledky a diskuse.....	39
4.1 Optimalizace podmínek pro separaci	39
4.1.1 Vliv složení mobilní fáze	39
4.1.2 Porovnání typu sorbentu stacionární fáze	42
4.1.3 Vliv pH pufru na separaci	42
4.1.4 Vliv teploty na separaci.....	43

4.2 Elektrochemická charakterizace hypericinu	44
4.3 Separace reálných vzorků	49
4.4 Kalibrace, mez detekce, mez kvantifikace.....	51
4.5 Kvantifikace hypericinu.....	54
4.6 Studium kinetiky fotodegradace	55
5 Závěr	61
6 Seznam použitých zkratk	62
7 Zdroje.....	63

1 Úvod

Podle legendy Hérodiané, když jí přinesli na podnosu uťatou hlavu sv. Jana Křtitele, v záchvatu zuřivosti propíchala světcův jazyk za to, že neutajil její morální poklesky. Poté z krve, která skapala na zem, vyrostla rostlina. Tato rostlina svým vzezřením má připomínat ten hrůzný čin co se stal, a to svými listy, které připomínají rozpíchaný jazyk, a krví sv. Jana Křtitele, která proudí v květních žlázkách. Takto se podle legendy zrodila třezalka tečkovaná nebo také známá jako bylina sv. Jana.

Když se oprostíme od legend a lidových příběhů, tak třezalka tečkovaná má skutečně široké léčebné využití. Třezalka patří mezi často využívané rostliny ať už v tradičním lidovém léčitelství, tak i v moderní medicíně. Vždyť první zmínky o léčebné využitelnosti této rostliny pocházejí z antického Řecka. Pro křesťany sloužila třezalka nejenom k léčení, ale i jako talisman k odhánění zlých sil. Hlavními látkami zodpovědnými za léčivé vlastnosti třezalky jsou hypericin a hyperforin, kromě nich jsou v rostlině přítomny i další látky mající léčivé schopnosti.

V současné medicíně se přípravky z třezalky využívají především jako antidepresiva. Vyjma antidepresivních vlastností se přípravky z třezalky vyznačují i antibakteriální, antivirovou a antioxidační aktivitou. Velký příslib do budoucna je využití hypericinu v rámci fotodynamické terapie.

Tato diplomová práce se zabývá především hypericinem, který se řadí mezi naftodianthrony. Kromě něj je v třezalce přítomen i pseudohypericin, strukturně i léčivými vlastnostmi podobná látka. Tyto látky se v největším množství vyskytují především v květech třezalky a tvoří charakteristické tmavé žlásky.

Cílem této diplomové práce je vyvinout a optimalizovat metodu separace pro stanovení množství hypericinu v tinkturách. Kromě stanovení se práce zabývá i elektrochemickou charakterizací samotného hypericinu. Dále byl zkoumán vliv záření na fototransformaci hypericinu a jeho následná fotosenzibilita. Pro analýzu hypericinu byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení se spektrofotometrickou (UV-VIS) a elektrochemickou detekcí (ECD). Důvodem pro využití obou detektorů bylo jejich vzájemné doplňování. UV-VIS detektor se vyznačoval vysokou selektivitou ovšem s malou citlivostí, oproti tomu měl elektrochemický detektor větší citlivost, avšak při některých měřeních byla horší selektivita.

2 Teoretická část

2.1 Čeleď Třezalkovité

Čeleď třezalkovitých (*Hypericaceae*) se skládá z více než 500 druhů, které se vyskytují na všech kontinentech (vyjma Antarktidy). Kromě arktických a pouštních areálů a nízko položených tropů lze rostliny z druhu třezalkovité nalézt po celém světě [1], [2].

Druhy rodu z třezalek (*Hypericum*) jsou v tradiční medicíně velmi hojně využívány kvůli svým různým léčivým vlastnostem. I přes velký počet druhů patřících do tohoto rodu, byla pouze třezalka tečkovaná studována jako farmaceuticky důležitá léčivá rostlina, jejíž extrakty jsou široce používány v Evropě, jako lék sloužící k léčbě mírné až středně těžké deprese [3].

Hlavní léčivá hodnota rostlin z rodu třezalek je přisuzována hlavně jejich fytochemikáliím, které mají široké spektrum biologických aktivit. Z nich konkrétně můžeme jmenovat deriváty floroglucinolu, naftodianthronů, různých fenolických sloučenin a esenciálních olejů. Z bioaktivních sloučenin patří mezi nejdůležitější látky hypericin a hyperforin, které jsou synergicky zodpovědné za antidepressivní aktivitu extraktů. Dále se uvádí, že hyperforiny vykazují protinádorové, protizánětlivé a antiangiogenní účinky [3], [4].

Jak už bylo zmíněno, nejrozsáhleji prostudovaným druhem z tohoto rodu je třezalka tečkovaná. Kromě ní byla věnována pozornost i některým dalším druhům třezalek (*Hypericum*), u nichž byly studovány jejich fytochemické vlastnosti a s tím související biologické aktivity. V následujících odstavcích si představíme několik význačných druhů třezalek.

Třezalka bobulovitá – *Hypericum Androsaemum* L.

Třezalka bobulovitá je středomořský léčivý malý stálezelený keř, vyskytující se v lesích. Známa je též jako keřovitá třezalka nebo „Tutsan“ („toutsaine“), což by v překladu znamenalo „vše zdravé“ - název odkazuje na její předpokládané léčivé vlastnosti. Ovšem v současné době jsou farmakologické aktivity třezalky bobulovité prozkoumány jen v omezené míře. Na rozdíl od většiny druhů třezalek, které mají suchou tobolku jako ovoce, produkuje třezalka bobulovitá masité bobulovité plody, které se při dozrávání mění z červené na černou [5]–[8].

Další zvláštností tohoto druhu je absence tmavých listových uzlíků, v nichž se syntetizují naftodianthrony, tudíž rostlinné extrakty neobsahují hypericin a jeho deriváty [5]–[8]. Ovšem absence hypericinu může být pro třezalku bobulovitou jistou výhodou. Jelikož hypericin je fotocitlivá látka, můžou vysoké dávky tohoto naftodianthronu vést ke kožním potížím, což při by použití masti z třezalky bobulovité nemělo nastat [9].

Tato rostlina se používá už od antiky, kdy ji Římané nebo Řekové používali pro léčbu zraněných vojáků vracejících se z bitvy. V tradiční portugalské medicíně se rostlina používá pro své močopudné a hepatoprotektivní vlastnosti. Ve Španělsku se přípravky z třezalky bobulovité používají jako antidepresivum a anxiolytikum. V Anglii se využívá pro přípravu mastí, které se užívají k léčbě ran [5]–[7], [10].

Třezalka velkolistá – *Hypericum grandifolium* Choisy

Třezalka velkolistá je endemický druh, známý též jako „malfurada“. Oblastí výskytu tohoto druhu třezalky jsou Azory, Madeira a Kanárské ostrovy. I když převládající oblastí výskytu je Makaronézie, byla třezalka velkolistá objevena i v Austrálii, na Novém Zélandu, Kalifornii, na Havaji a v Jižní Africe. Jedná se jako u předchozí třezalky o vždyzelený keř, který roste do výšky až 1,8 m, s tmavě zelenými listy a s zřetelně žlutými květy [5], [11]–[13].

Třezalka velkolistá a další druhy třezalek byly používány v lidovém léčitelství na Kanárských ostrovech jako sedativum, antihysterikum, antidepresivum, diuretikum, antiparazitikum a pro hojení ran [5], [13], [14].

Zkoumání obsahu fytochemikálií třezalky velkolisté odhalilo přítomnost hyperforinu, flavonoidů a pravděpodobně benzofenonových derivátů, zatímco naftodianthrony (hypericin) chyběly. I přes absenci naftodianthronů vykazují však přípravky z třezalky velkolisté antidepresivní účinky. Přestože přesný mechanismus antidepresivních účinků zůstává nejasný. Pravděpodobně za antidepresivní účinky mohou být zodpovědný serotoninergní mechanismus a aktivní sloučeniny (flavonoidy, deriváty benzofenonu) [11], [13].

Třezalka čínská – *Hypericum monogynum L (syn. Hypericum chinense)*

Třezalka čínská je polozelený keř s úzkými listy. Kvete od léta do podzimu a květy této třezalky obsahují viditelné zlatavé tyčinky. Je široce pěstována v Jižní Africe, východní a jižní Asii, Austrálii, Střední Americe, severozápadní Evropě a na Mauriciu, přesto je rozšířena hlavně v Číně a v některých oblastech Japonska. Mezi jeho sekundární metabolity patří floroglucinoly, terpenoidy a xanthony. Má značný význam jako tradiční lidový lék pro léčbu dysmenorrhey a dalších ženských potíží, hypertenze, hepatitidy, kašle, akutního zánětu hltanu i hrtanu, černého kašle, zánětu spojivek, revmatické artritidy, či po kousnutí jedovatými zvířaty. Mimo využití rostliny v tradičním čínském léčitelství pro léčbu různých nemocí se pěstuje také jako okrasná rostlina [1], [5], [15], [16].

Třezalka origanolistá – *Hypericum origanifolium Wild*

Třezalka origanolistá je druh vyskytující se v Turecku, Arménii a Gruzii. Roste v travnatých společenstvech na skalních svazích nebo stepích. Skládá se z 5-30 cm dlouhých stonků, četné květy mají zlatožlutou barvu, dále kalichy a lístky obsahují povrchové černé žlázové tečky. Obecně třezalky včetně této hrají důležitou roli v tureckém lidovém léčitelství, kde se používají jako sedativa, antiseptika nebo proti křečím [17]–[20].

Kyselina chlorogenová, kvercetin, rutin, pseudohypericin, hyperforin, hypericin a hyperosid jsou látky obsažené právě v třezalce origanolisté. Díky těmto látkám bývá třezalka origanolistá považována za nový cenný druh, který může nahradit na evropském trhu dobře osvědčenou třezalku tečkovanou. I když už bylo provedeno několik studií s cílem identifikovat komponenty této třezalky, tak existuje jen několik studií farmakologických vlastností. Podle již provedených studií byla prokázána antioxidační aktivita, ochranný účinek proti selhání ledvin/reperfusionnímu poškození a vliv na aktivitu centrálního nervového systému [17]–[20].

Hypericum sampsonii Hance

Tato třezalka se řadí mezi vytrvalé vzpřímené rostliny, jejíž místem výskytu je jižní Čína, Japonsko, Barma, severní Indie a Tchaj-wan. V Číně se lidově nazývá „Yuanbao Cao“, právě kvůli jeho listům, které vypadají podobně jako Jin Yuanbao (zlatý ingot, zlatý peníz starověké Číny). V Tradiční čínské medicíně se užívá celá rostlina této třezalky, a to zejména etnickými skupinami v jihozápadní oblasti Číny. Užívá se hlavně k léčbě otoků, infekce prsní žlázy, popálenin, revmatoidní artritidy, ženské abnormální menstruace, po hadím

ušknutí a krvácení, zánětu tenkého střeva a úplavice. Některé etnické skupiny používají *Hypericum sampsonii* jako materiál pro léčivé koupele za účelem očištění těla a zbavení se různých nemocí. Dalším zajímavým využitím této třezalky je obyvateli severočínské Guangxi při festivalu Dračích lodí, kdy bylinná koupel v tomto období symbolizuje uctění památky velkého léčitele Sun Simiao [21]–[25].

Studie zaměřené na studium obsažených látek poukazují na přítomnost některých fenolických sloučin (xantony, benzofenony, floroglucinoly, flavonoidy) a polycyklických polyprenylovaných acylfloroglucinolů (PPAP). Poslední zmiňované PPAP vykazovaly cytotoxické aktivity *in vitro*. Díky vazbě mezi rakovinou a zánětem by mohly mít sloučeniny s protizánětlivými vlastnostmi potenciál při léčbě rakoviny [21]–[26].

2.2 Třezalka tečkovaná-*Hypericum perforatum*



Obr. 1 - Třezalka tečkovaná[27]

2.2.1 Botanický popis

Statná, vytrvalá, 40-60 cm vysoká lysá bylina. Lodyha je většinou nevětvená, obvykle s vyniklou hlavní lištou, s úžlabními výhonky kvetoucími v horní polovině lodyhy. Listy jsou přisedlé, nejčastěji podlouhlé nebo vejčité, tupé až tupě špičaté s okrajem slabě až silně podvinutým, s velkými tečkovitými siličnými nádržkami a černými tečkovitými žlázkami, přičemž proti světlu prosvítají jen hlavní žilky. Květenství bývá bohaté, obsahující velké množství zlatožlutých květů, které jsou ve špičce žláznatě tečkované a čárkované.

Jedná se o rostlinu vyhledávající slunné stráně, sušší louky, pastviny, úhory, skály, paseky, lesní lemy, světlé listnaté lesy, meze a travnaté okraje cest, tedy druh s širokou ekologickou i cenologickou amplitudou. V České republice je její výskyt hojný. Roste od nížin do montánního stupně, jednotlivě i výše (minimum: Hřensko, cca 115 m. n. m.; Radhošť, cca 1130 m. n. m.; může být však zavlečena do vyšších poloh).

2.2.2 Význam v tradiční medicíně

Z mnoha léčivých bylin, které byly používány v průběhu historie evropské kultury, byla třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum L.*) vždy velmi populární. Už od dob starověkých Řeků až do středověku byly rostlině přisuzovány magické vlastnosti a byla používána k odehnání zla a ochraně před chorobami. Jako praktický lidový lék našla třezalka široké uplatnění při léčbě ran, při léčbě potíží s ledvinami a k zmírnění nervových poruch, někdy i při zmírnění šílenství [28].

Název rostliny *Hypericum* pochází z řeckého názvu rostliny a může mít několik významů. Jedno z obvyklých vysvětlení původu jména *Hypericum* vychází ze slov *ereike* (vřes) a *hyper* (výše). I když existuje jeden řecký druh třezalky, který se podobá vřesu, je pravděpodobnější, že název *Hypericum* je odvozený od slov *eikon* (údaj, nebo případně nežádoucí zjevení) a *hyper* (výše), což souvisí se starodávným užíváním třezalky tečkované k vymítání zlých duchů a sil. Přírodovědec Carl Linné, který tento rod popsal, se domníval, že název *Hypericum* pochází ze slov *yper* (svrchní) a *eikon* (obrázek). Druhé jméno *perforatum* je odvozeno od vodoznaku průsvitných teček, které lze spatřit, když se list zvedne ke slunci [28], [29].

Anglický název pro třezalku tečkovanou – St. John's wort – je odvozen od tendence rostliny kvést okolo 24. června, kdy se slaví svátek sv. Jana (slovo wort znamená ve staré angličtině rostlinu). Ranní křesťané věřili, že největšího účinku se dosáhne, pokud se rostlina sklídí právě o svátku sv. Jana, což je často období vrcholného květenství. V tento svátek si lidé zavěšovali třezalku na dveře od domu. Věřili, že je to ochrání před zlými démony a jejich kouzly, a taktéž před nemocemi a újmami [29], [30].

Tento druh třezalky je velmi populární v Turecku, kde se používá k hojení ran, a to nejčastěji ve formě oleje. Ve střední Itálii se používá latex získaný z rostliny na rány a odvar z listů se užívá k opláchnutí ran a urychlení zacelení ran. V oblasti Itálie (Ligurie) se pro stejný účel volí olejový extrakt. Podobné využití má tento druh i na Pyrenejském poloostrově (Navarra), kde se používá k léčbě ran, popálenin, bolesti zad a infekcí a ke hydrataci nebo jako antidepresivum [31]–[34].

Další oblastí, kde je třezalka tečkovaná taktéž velmi oblíbená, je Balkánský poloostrov. V oblastech východní, severní Bosny a Hercegoviny, Srbska, Kosova, východní Albánie, Černé Hory, Makedonie a severozápadního Řecka jsou známé léčivé vlastnosti třezalky tečkované (především nadzemní části). Zdejší lidé připravují nálev nebo olejový

extrakt z nadzemních částí rostliny, sklizených v období květu, nebo se aplikují sušené nadzemní části přímo na rány. Ovšem nejčastěji užívanou formou je třezalkový olej, který se připravuje macerací čerstvě sklizené byliny, zpravidla ve slunečnicovém nebo olivovém oleji po dobu 40 dní, přičemž je nádoba po celou dobu vystavena slunečnímu svitu. Ve venkovských oblastech se přípravky třezalky tečkované používají k léčbě popálenin, tržných ran, kožních vředů, hematomů a ke zmírnění příznaků hemoroidů [34]–[37].

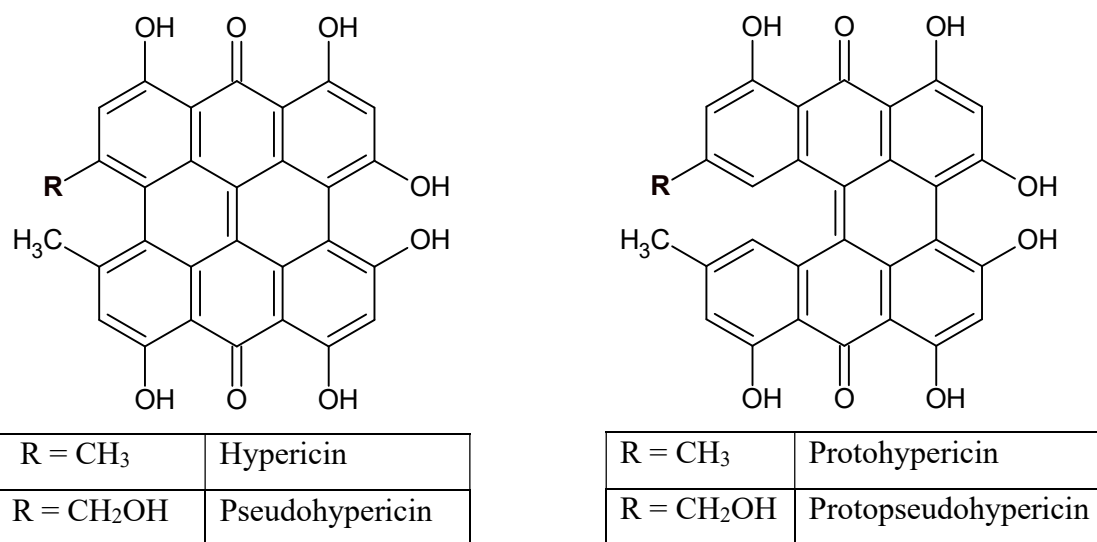
V Estonsku se pro rostliny z rodu *Hypericum* používá lidové označení – naistepuna. Zdejší obyvatelé připravují z této rostliny především rekreační čaj a podle historických údajů se třezalka používala jako koření v domácnosti. Dalším zajímavým způsobem využití třezalky je naložení květních pupenů do vodky, kterou tím zbarví do červena. Místní lidé pro ni mají pojmenování, které v angličtině znamená „vodka flower“. Takto připravená vodka se používala jako rituální nápoj pro ženy v období menstruace. Tento zvyk je spíše regionálního původu [38], [39].

V současné tradiční medicíně se třezalka tečkovaná užívá při hojení ran, pro léčbu různých kožních potíží, stejně tak lze použít i při léčbě problémů v trávicí, dýchací a nervové soustavě (deprese) [31]–[34].

2.2.3 Obsahové látky

V třezalce tečkované je obsaženo několik tříd biologicky aktivních sloučenin [40]. V literatuře je uváděna distribuce prenylovaných acylfloroglucinolů, meroterpenoidů, flavonoidů, naftodiantronů, xanthonů a floroglucinolů [41]. Koncentrace složek často kolísá z důvodu genetické variace v rámci druhu, ekologických faktorů, doby sklizně, přípravy a zpracování materiálu vzorku a skladovacích podmínek [40].

Hypericin a pseudohypericin



Obr. 2 - Struktury hypericinu a pseudohypericinu a jejich protoforem

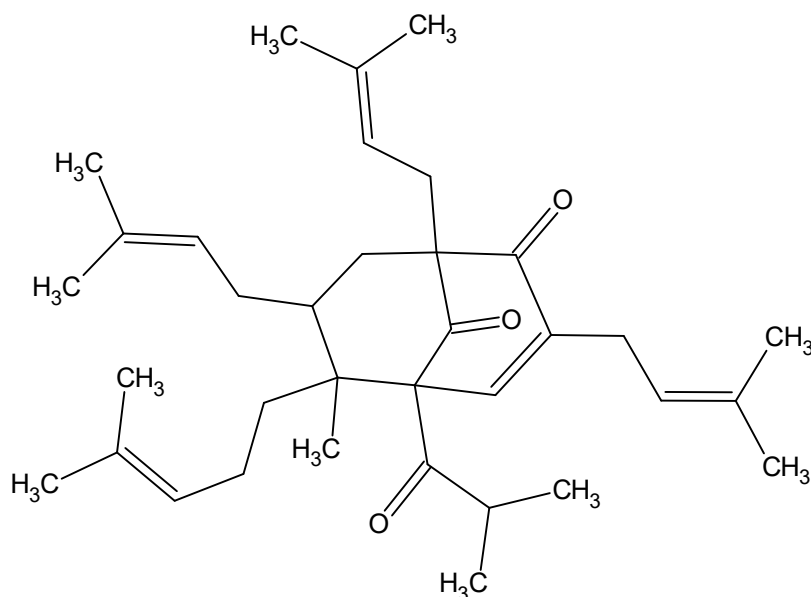
Přírodní sloučeniny hypericin a pseudohypericin se strukturálně řadí mezi naftodianthrony, červeně zbarvené pigmenty s rozsáhlým systémem kondenzovaných aromatických kruhů, patřící mezi charakteristické látky rodu třezalkovitých. U třezalky tečkované se množství naftodianthronu pohybuje v rozmezí 0,05 až 0,30 %. Rostlina rovněž obsahuje protohypericin, protopseudohypericin a cyklopseudohypericin. Tyto látky jsou lokalizovány především v kvetoucích částech rostliny, zejména v tmavých žlázách. Protohypericin a protopseudohypericin se považují za biosyntetické prekurzory hypericinu a pseudohypericinu, kdy se vlivem světelného záření přeměňují na dané produkty. Protohypericiny, protopseudohypericiny a cyklopseudohypericiny jsou detekovány při

nižších koncentracích a jsou zahrnuty v analytickém termínu „celkové hypericiny“ nebo „celkové naftodianthrony. Obecně je množství pseudohypericinu (0,03-0,34%) dvakrát až čtyřikrát vyšší než hypericinu (0,03-0,09%) [42].

Hypericin byl poprvé izolován v roce 1830 a o více než století později (1953) byla určena jeho struktura. Hypericin je silně lipofilní molekula, která je špatně rozpustná v nepolárních rozpouštědlech, vodných roztocích a oleji. Ve většině organických rozpouštědlech tvoří červený roztok, ve vodě se vytváří disperze jemných částic. V UV-Vis spektru poskytuje hypericin dva absorpční pásy při 590 a 510 nm [43].

Za fotodynamické vlastnosti tohoto derivátu chinonu je zodpovědný aromatický charakter molekuly. Tyto vlastnosti se využívají při protivirových a protinádorových terapiích (viz kapitola **Fotodynamická terapie**, str. 25). Fototoxicita je způsobena tvorbou singletového kyslíku, toto vede k fotooxidačnímu poškození buněk nebo posunutí pH po excitaci. Mimo účinků závislých na světelném záření jsou zaznamenány specifické jevy, které jsou následkem inhibice fyziologicky důležitých enzymů hypericinem [44].

Hyperforin



Obr. 3 - Struktura hyperforinu

Hyperforin se řadí mezi polyprenylované deriváty acylfloroglucinolu a tvoří nejvíce zastoupenou lipofilní složku alkoholických extraktů třezalky tečkované [45]. Patří mezi nejvýznamnější polycyklické polyprenylované acylfloroglucinoly. Po staletí byl hyperforin zaznamenáván jako aktivní složka třezalky tečkované. Hyperforin vykazuje antidepresivní, protirakovinné, antibiotické a prokognitivní účinky [46].

Hyperforin je složen ze směsi vzájemně se přeměňujících se tautomerů. Je citlivý na světlo, nepolární rozpouštědla, teplotu a na kyslík. Díky náchylnosti k oxidaci byl přínos hyperforinu k farmakologickému profilu zanedbáván, dokud nebyla provedena lipofilní superkritická extrakce pomocí CO₂, která poskytla extrakty bohaté na hyperforin (38,8 %), avšak postrádající hypericin. Nejběžnějšími rozpouštědly pro extrakci hyperforinu jsou ethanol, n-hexan a CO₂ [47].

Jednou z možných stabilizací hyperforinu je využití slabých bází. Velmi oblíbenou slabou bází je např. dicyklohexylamin. Biologická aktivita této slabé soli je srovnatelná díky uvolňování hyperforinu v roztoku [47].

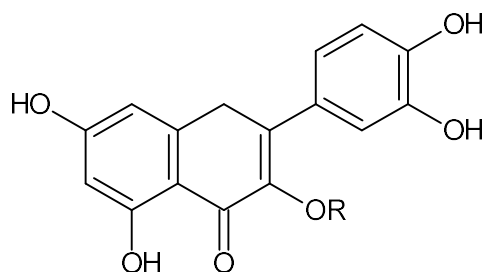
Hyperforin je znám zejména pro své antidepresivní účinky. Je popisován jako inhibitor zpětného vychytávání mnoha neurotransmiterů (serotonin, dopamin, L-glutamát, norepinefrin, kyselina γ -aminomáselná (GABA)). Mezi hlavní molekulární mechanismy vychytávání neurotransmiterů patří protonoforické vlastnosti a aktivace přechodného

receptorového potenciálního kanálu 6 (TRPC6). Panují názory, že antidepresivní účinky jsou zprostředkovány hyperforinově závislou nepřímou inhibicí zpětného vychytávání transmiterů a zatížením vezikulárního transmiteru na popud protonoforické aktivity hyperforinu bez aktivace TRPC6 [48].

Flavonoidy

Flavonoidy jsou skupina přírodních látek s variabilní strukturou, které se vyznačují antioxidačními, antimutagenními, antikarcinogenními a protizánětlivými účinky. V dnešní době jsou flavonoidy považovány za nezbytnou složku ve farmaceutických, kosmetických, lékařských a nutričních aplikacích [49].

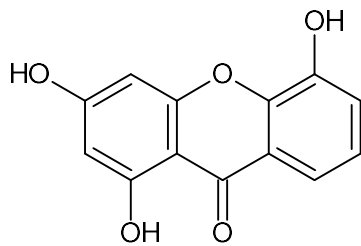
Třezalka tečkovaná obsahuje fenolové kyseliny i velké množství flavonoidů (hyperosid, rutin, kvercetin, kvercitrin, isokvercitrin, miquelianin, astilbin, I3,I18-biapigenin, amentoflavon) [50].



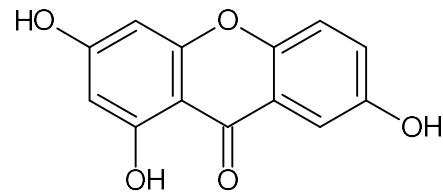
R = H	Kvercetin
R = α -L-rhamnosyl	Kvercitrin
R = β -D-glykosyl	Isoquercitrin
R = β -D-galaktosid	Hyperosid
R = β -D-rutinosyl	Rutin

Obr. 4 - Struktury nejvíce zastoupených flavonoidů třezalky tečkované

Xanthy



1,3,5-trihydroxyxanthon



1,3,7-trihydroxyxanthon

Obr. 5 - Struktury hlavních xanthonů třezalky tečkované

Xanthy jsou specializované metabolity s antimikrobiálními vlastnostmi, které se hromadí v kořenech třezalky tečkované [51]. Xanthy se řadí do třídy polyfenolů. Taktéž vykazují řadu zdokumentovaných vlastností, mezi něž patří inhibice monoaminoxidázy, antimikrobiální, cytotoxické, hepatoprotektivní a antioxidační účinky[52].

2.2.4 Droga a její využití

Údaje z průzkumu trhu Spojených států amerických ukazují, že se neustále zvyšuje popularita produktů „přírodního zdraví“ a doplňků stravy, obsahujících rostlinné přísady. V roce 2016 hodnota maloobchodního prodeje „bylinných doplňků“ činila více než 7,4 miliardy amerických dolarů, což oproti údajům z roku 2006 a 2011 podstatný nárůst (4,6 miliardy dolarů, resp. 5,3 miliardy dolarů). Přípravky z třezalky tečkované patří mezi oblíbené rostlinné produkty. Z analýzy z roku 2016 vyplývá, že přípravky obsahující třezalku tečkovanou jsou v žebříčku maloobchodního prodeje na třicátém sedmém místě v rámci „bylinných doplňků“ [53].

Produkty na bázi léčivých rostlin a jejich přípravků jsou obecně označeny výrazem „rostlinné látky“. Tento výraz souvisí v Evropě jak s rostlinami, jejich přípravky, primárními extrakty, tak i s rafinovanými extrakty. Rostlinné látky jsou na evropském unijním trhu široce dostupné a v nabídce je řada produktů se značnými rozdíly v klasifikaci. V rámci komerčních možností jako je čas/náklady na vývoj produktu, žádost o registraci, povolené

indikace, možnosti reklamy se tyto produkty prodávají v EU jako rostlinné léčivé přípravky (herbal medicinal product-HMP), doplňky stravy (food supplements-FS), kosmetické nebo zdravotnické prostředky. V Evropské unii mají rostlinné produkty různé definice a každá klasifikace má svůj vlastní právní rámec a kritéria, která musí být splněna [54], [55].

Antidepresivní účinky

Extrakty třezalky tečkované jsou oblíbené jako možná alternativa k syntetickým antidepresivům nebo pro behaviorální terapii při léčbě mírných až středně těžkých forem depresivních poruch. Data z provedených studií ukázala, že právě flavonoidy, hyperforiny a hypericiny mohou vést ke klinické účinnosti při léčbě deprese [56], [57].

Při léčbě deprese přípravkem z třezalky tečkované je mechanismus následující: hypericin inhibuje monoaminoxidázu (MAO), frakce flavonoidů přítomných v extraktu, které jsou strukturně podobné inhibitorům MAO, rovněž inhibují MAO. Dále dochází k potlačení uvolňování interlekinu 6, tj. látky, která souvisí s depresí jako modulát k uvolnění kortizolu. Za inhibici zpětného vychytávání serotoninu, norepinefrinu, dopaminu a kyseliny gama-aminomáselné je zodpovědný hyperforin. Taktéž je inhibován enzym katechol-O-methyltransferaza [58], [59].

Antibakteriální aktivita

V třezalce tečkované je obsaženo rozsáhlé množství biologicky aktivních sloučenin. Jako hlavní složky zodpovědné za antimikrobiální aktivitu se uvádí hyperforin a hypericin. Bylo zjištěno, že extrakty z třezalky tečkované jsou více aktivní proti gram-pozitivním bakteriím než proti gram-negativním [60].

Hyperforin vykazoval účinky inhibice růstu všech testovaných gram-pozitivních bakterií, včetně MRSA (methicillin-rezistant *Staphylococcus aureus*) a P(penicillin)RSA, ovšem ne proti gram-negativním bakteriím. Jak již bylo řečeno, antibakteriálními účinky disponuje rovněž hypericin. Samotný hypericin nevykazuje cytotoxicitu. Až při ozařování světlem dochází k poškození membrány a buněčné smrti (viz kapitola **Fotodynamická terapie**, str. 25). Účinně zastavuje růst *S. aureus in vitro*, ovšem proti *Escherichia coli* vykazuje nízkou účinnost. Citlivost některých druhů bakterií souvisela s množstvím přijatého hypericinu, což může odrážet rozdíly v membránové struktuře mezi

gram-pozitivními a gram-negativními bakteriemi. Obecně lze říct, že gram-pozitivní bakterie jsou náchylnější k působení třezalky, nicméně ne všechny gram-negativní druhy jsou rezistentní proti působení hypericin, který je následně vystaven působení světelného záření [61], [62].

Antivirová aktivita

Extrakty třezalky tečkované byly taktéž studovány z hlediska jejich antivirové aktivity. Ukázalo se, že extrakty třezalky tečkované mají významné účinky proti viru infekční bronchitidy *in vivo* a *in vitro*. Za které jsou zodpovědné především pseudohypericin, hypericin, hyperosid, kvercitrin a kvercetin [63].

Dále byl hypericin testován jako antivirové činidlo pro inhibici replikace viru žloutenky typu C. Bylo zjištěno, že hypericin inhiboval replikaci viru žloutenky typu C pomocí down-regulace HO-1 a deacetylase a nevykazoval přitom žádnou cytotoxicitu. Ovšem k převedení antivirových vlastností *in vivo* a *in vitro* hypericinu do klinických aplikací je potřeba dalšího bádání [64].

Inhibitor oxidativního stresu

Příčinou vzniku oxidativního stresu je nadměrná produkce reaktivních forem kyslíku, které biologický systém není schopen detoxikovat. Jako reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou obvykle definovány radikály superoxidu ($O_2^{\bullet-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxy radikály ($\bullet OH$) a singletový kyslík (1O_2). Tyto ROS jsou generovány jako vedlejší produkty metabolitu biologickými systémy. Některé procesy jako fosforylace proteinů, apoptóza, aktivace mnoha transkripčních faktorů, imunita a diferenciacie jsou závislé na správné tvorbě ROS a jejich přítomnosti uvnitř buněk, které je potřeba udržovat na nízké úrovni. Při zvýšené produkci ROS dochází k škodlivému vlivu na důležité buněčné struktury jako jsou proteiny, lipidy a nukleové kyseliny [65]–[68].

Vyvinulo se složité uspořádání antioxidační obrany, které má funkci udržovat tvorbu ROS v rovnováze. Ovšem i přesto může být tato rovnováha narušena, což vede k oxidačnímu stresu. Díky mnoha různým účinkům, které může mít toxicita kyslíku na buňku, je oxidativní stres nejlépe formulován jako změna prooxidačně-antioxidační rovnováhy ve prospěch prvního jmenovaného, což může vést k poškození. Značný počet

důkazů nám dává najevo, že oxidační stres může být různou měrou zodpovědný, za vznik a/nebo vývoj několika nemocí (tj. rakovina, cukrovka, metabolické poruchy, ateroskleróza a kardiovaskulární onemocnění). V dnešní době je uznávána role oxidačního stresu v patofyziologii různých poruch, včetně komplikací v těhotenství nebo mužské neplodnosti [67], [69], [70].

Studie odhalily, že přípravky z třezalky tečkované tlumí apoptózu několika typů buněk vyvolanou oxidačním poškozením. Fytochemikálie zodpovědné za antioxidační účinky třezalky tečkované jsou flavonoidy, a nikoliv hypericiny nebo hyperforiny, které jsou spojovány především s psychoaktivními účinky. Flavonoidy obsahují více fenolických hydroxylových skupin s mnohostrannými antioxidačními funkcemi. Z obsažených látek třezalky jsou za antioxidační aktivitu zodpovědné především aglykony kvercetin a glykosidy kvercetin (hyperosid, rutin, kvercetin atd.). Farmakokinetika antioxidačních fytochemikálií ukazuje, že požití přípravku třezalky tečkované aspoň 2 hodiny před jídlem může způsobit inhibici oxidačního stresu [71]–[73].

Fotodynamická terapie

Principem fotodynamické terapie je podání fotosenzibilního barviva, takzvaného fotosenzibilizátoru, jehož funkcí je selektivní hromadění v nádoru, a poté dochází k ozáření léze pomocí světelného zdroje s vhodnou vlnovou délkou, která odpovídá absorpčnímu spektru fotosenzibilizátoru. Po excitaci daného fotosenzibilizátoru je vyvolán cytotoxický účinek. Tímto způsobem jsou produkovány reaktivní formy kyslíku, které jsou následně zodpovědné za oxidaci biomolekul, což způsobí buněčnou smrt a nekrózu maligní tkáně. Fotodynamická terapie je ve své podstatě vícefaktorový proces, který obvykle zahrnuje apoptickou smrt nádorových buněk, degeneraci nádorové vaskularity, stimulaci protinádorové imunitní odpovědi a indukci zánětlivých reakcí v ozářené lézi. Pro tyto účely byla zavedena celá řada komerčních sloučenin s fotocitlivou aktivitou. I když se mnoho studií věnuje tomuto problému, tak se jen velmi málo z nich zaměřuje na užití přírodních léčivých rostlinných extraktů [74]–[77].

Kombinací fotodynamické terapie s jinými léčebnými metodami (chemoterapie, radioterapie, imunoterapie) při léčbě různých typů rakoviny lze dosáhnout lepších výsledků než při použití monoterapie. Mezi výhody kombinované terapie patří menší

vedlejší účinky a omezení množení rakovinných buněk. Přesto bylo vyvinuto jen málo fotosenzibilátorů a ještě méně jich bylo použito v klinické praxi [74].

Myšlenka použití fotosenzibilátoru pocházejícího z léčivých rostlin obsahuje ve své podstatě řadu rozporů. Rostliny, které se během tisíciletí vyvinuly pro růst na slunečním světle, nemohou obsahovat vysoce aktivní molekulu fotosenzibilátoru. I přesto všechno existuje několik izolantů z rostlin, které se využívají jako fotosenzibilátor (hypericin, hypocrellin, riboflavin, kurkumin) [77].

Hypericin extrahovaný z třezalky tečkované se řadí mezi přírodní fotosenzibilátory a užívá se v klinické fotodynamické terapii. Přesné mechanismy buněčné absorpce hypericinu zůstávají nejasné a vyžadují další zkoumání, ovšem výsledky naznačují, že hypericin může být transportován do nebo skrz buňky pomocí teplotně závislé difúze, dělení, pinocytózy nebo endocytózy. Pomocí společného značení rakovinných buněk hypericinem a fluorescenčními barvivy specifických pro buněčné organely bylo odhaleno, že k hromadění hypericinu dochází v membránách endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu, lysozomech a mitochondriích [9].

Fytcytotoxicita hypericinu je závislá na kyslíku, jelikož za hypoxických podmínek nejsou fotocytotoxické účinky přítomny. Na finální odpověď zprostředkovanou fotodynamickou terapií může mít vliv také schopnost buněk překonat oxidační stres pomocí aktivity různých cytoprotektivních mechanismů včetně buněčných redoxních systémů. Dalším krokem ke zlepšení přístupu při léčbě rakoviny je vyvinutí vhodného transportního systému a zlepšení cílení na rakovinné buňky. Jedním z možných řešení je použití lipoproteinů jako přirozeně založených transportérů, které mohou být efektivní při dodávání hydrofobních molekul. Výsledky studií přinesly informace, že nízkodenzitní lipoprotein a vysokodenzitní lipoprotein by mohly být efektivně použity pro transport a cílení hypericinu na rakovinné buňky [9], [78].

Dalším využitím hypericinu je efektivním cílením na mitochondrie, což je jedna z možných strategií při léčbě rakoviny. Bylo zjištěno, že hypericin je účinným ligandem cíleným na mitochondrie. Hypericin funkcionalizovaný oxidem grafenu ve spojení s doxorubicinem zvyšoval synergickou protirakovinnou účinnost chemoterapie a fototerapie bez očividných nežádoucích vedlejších účinků. Testy *In vitro* a *in vivo* ukazují, že takto funkcionalizovaný hypericin způsobuje indukci exprese klíčových proteinů mitochondriemi zprostředkované apoptózy a dochází tak k apoptóze buněk karcinomu prsu. Mimo to

vykazoval oxid grafenu nízkou toxicitu vůči zdravým buňkám, což indikuje vysokou bezpečnost funkcionalizovaných přípravků oxidů grafenu. Ve spojení s laserovým ozařováním by se mohlo jednat o zajímavou metodu protinádorové terapie, ovšem jsou vyžadovány další výzkumy, aby mohl být tento typ léčby využit v klinické praxi [79], [80].

Léčba kožního melanomu

Kožní maligní melanom se řadí mezi nejsmrtelnější typ rakoviny kůže. I přes řadu léčebných terapií, počítaje imunoterapii, chemoterapii, biochemoterapii a radioterapii, jsou pokročilá stadia metastatického melanomu odolná k chemoterapeutické léčbě s pětiletou mírou přežití v 15 % případech. Jako potenciální léčba těchto onemocnění se jeví fotodynamická terapie. Málo invazivní dvou kroková léčba lokálně zacíleného nebo systémového podávání fotosenzibilizátoru, poté ozáření tumorigenních buněk nebo nádoru viditelným světlem v přítomnosti molekulárního kyslíku [81], [82].

Ukázalo se, že hypericin byl přijatelně vychytáván melanomovými buňkami a transportován do různých intracelulárních organel. Po ozáření docházelo ke ztrátě integrity buněčné membrány, smrštění buněk a apoptóze. Fotodynamickou terapii spolu s chemoterapií lze nabídnout jako potenciální doplňkovou terapii pro léčbu metastatického melanomu. Tato sdružená terapie účinně zmenšuje životaschopnost melanomových buněk, mimo to ruší schopnost obnovení melanomových buněk [81], [83], [84].

Toxicita

Použití přípravků z třezalky může být rizikové pro lidi, kteří se sami léčí s potenciálně závažnými psychopatologickými stavy, pro které není žádný záznam o snášenlivosti či účinnosti. Některé složky třezalky tečkované silně indukují enzymy, tudíž je nutné vzít v potaz jejich farmakokinetické interakce při současném užívání léků [85].

Mezi nejčastěji hlášené vedlejší účinky při použití komerčních extraktů pro léčbu deprese patří gastrointestinální podráždění, alergické reakce, únava a nervozita. Nežádoucí reakce vyvolané přípravky z třezalky jsou obecně mírné, přechodné a podobné placebo. Množství nežádoucích reakcí bylo 10krát nižší než u syntetických antidepresiv. Mezi další hlášené vedlejší účinky patřila fotodermatitida. K té docházelo při denních dávkách 2-4 g komerčního přípravku, což je zhruba 5-10 mg hypericinu [86], [87].

2.3 Analytické metody použité při studiu třezalky tečkované a hypericinu

2.3.1 Spektrální metody

Na rozdíl od chromatografických technik jsou přímé spektroskopické techniky rychlé a levné, zařízení spektrometrů jsou snadno ovladatelné a během analýzy generují malé množství organického odpadu[88].

Zobrazovací metody Fourierovy infračervené spektroskopie (FTIR) v kombinaci s metodami analýzy dat byly využity ke studiu morfologických a molekulárních struktur třezalky tečkované [89]. Získané výsledky pomocí FTIR byly srovnávány s histologickými informacemi získanými ze světelné mikroskopie. Autoři poukazují, že FTIR zobrazování může být použito semikvantitativní zobrazení lipidů, fosfolipidů, proteinů, celulózy, nukleových kyselin a uhlovodíků.

Stejní autoři se dále zaměřili na vývoj analytické platformy, jež by umožnila přímou analýzu i kontrolu kvality třezalkových extraktů a přípravků [90]. Ve studii bylo demonstrováno, že kombinace separačních technologií s hmotnostní a vibrační spektroskopií umožňuje poskytnout hlubší vhled do složení a lze taktéž identifikovat látky, které jsou charakteristické pro třezalku tečkovanou s čínským původem.

J. D. Owen a kol. [91] si dali za cíl vyvinout metodu pro analýzu přípravků z třezalky tečkované za pomoci indukčně vázaného plazmatu s optickou emisní spektroskopií pro stanovení 11 prvků (Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Sr a Zn).

Zkoumáním kovů (Ca, Cu, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni a Zn) v různých přípravcích třezalky tečkované pomocí plamenové absorpční spektrometrie a elektrotermické atomové absorpční spektrometrie se zabýval M. R. Gomez a kol. [92]. Také byly zkoumány charakteristické složky pro sestavení fingerprintu pomocí kapilární elektroforézy pro odhalení cizích látek ve fytofarmaceutických výrobcích.

A. Booker a kol. [93] srovnávali kvality registrovaných výrobků Traditional herbal registration (THR) s neregistrovanými. Jednotlivé produkty (granulované prášky, extrakty) byly analyzovány pomocí vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie a ^1H NMR spektroskopie. Bylo zjištěno, že 36 % zkoumaných komerčních výrobků THR bylo zfalšováno, pravděpodobně jinými druhy *Hypericum* pocházejících z Číny nebo použitím odlišných kultivarů. Dále bylo zjištěno, že u 19 % výrobků docházelo k přidávání

potravinářských barviv. Obecně doplňky stravy a nelicencované produkty mají horší kvalitu než registrované THR, až 53 % z nich nemělo stejný fingerprint jako referenční standardy.

Při analýze extraktů [94] ^1H NMR spektroskopii byly extrakty rozpuštěny v 700 μl DMSO- d_6 . Spektra byly měřeny při frekvenci 600 MHz a jako standard byl použit tetramethylsilan. Pro získání hmotnostních spekter byl použit spektrometr s atmosférickou chemickou ionizací, se sondou pro přímé vložení a s analyzátozem doby letu (TOF). Byl nastaven pozitivní ionizační mód. Pro získání infračerveného spektra v rozmezí 4000-400 cm^{-1} byl použit FTIR spektrometr s ATR nástavcem s diamantovým krystalem.

Schopnost hypericinu (rozpuštěného v čistém DMSO) interagovat s modelovým mutagenem byla zkoumána pomocí absorpčních a fluorescenčních metod. Pro absorpční analýzu byla použita 1 cm kyveta, rozmezí vlnových délek činilo 300-800 nm. Fluorescenční analýza probíhala v 0,4 x 1 cm kyvetě za použití excitační vlnové délky 567 nm a 606 nm s excitační a emisní spektrální šířkou 2,5 a 5 nm. Jako další metoda byla použita časově rozlišená fluorescence, kde excitace byla dosažena pulzní diodou při 574 nm a následná fluorescence byla pozorována při 600 a 645 nm. Všechna měření probíhala při 2 nm excitační a emisní spektrální šířce [95].

2.3.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je nejčastěji využívána při charakterizaci esenciálních olejů třezalky tečkované. Jako spolehlivý detektor pro kvantifikaci esenciálních složek oleje se ukázal plamenově-ionizační detektor (FID). Identifikaci píků v chromatografu lze určit pomocí jejich retenčních indexů nebo srovnání fragmentačních spekter s údaji v databázích [96].

Analýzou hydrodestilovaných éterických olejů pomocí GC se zabýval A. Bertoli a kol. [97]. Tato technika byla zvolena, protože představuje pro analýzu éterických olejů získaných z třezalky tečkované techniku první volby v oficiální kontrole kvality rostlinného materiálu. GC-FID byl použit pro kvantifikaci složek oleje. Pro získání hmotnostních spekter byla použita elektronová a chemická ionizace. Jako detektor byla použita iontová past. K identifikaci píků byly použity lineární retenční indexy. Získaná MS spektra byla srovnávána se spektry v databázi.

Pro profilování metabolitů k odlišení třezalky tečkované od ostatních rostlin z rodu *Hypericum* byl použit GC-FID [88]. Byla zvolena kapilární kolona (30 m x 0,32 mm; 0,25 μm tloušťka filmu). Teplotní program byl nastaven na rozsah 70-230 °C, teplota dávkovače a rozhraní činila 250 a 300 °C. Objem vstříkovaného analytu byl 1 μl. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 2 ml/min.

2.3.2 Kapilární elektroforéza

Pro separaci a detekci osmi flavonoidů pocházejících ze tří rostlin využívaných v tradiční čínské medicíně (jednou z rostlin je třezalka tečkovaná) byla použita kapilární elektroforéza (CZE) s wall-jet amperometrickou detekcí [98]. Experiment probíhal na domácí vyrobeném kapilárním elektroforetickém systému. V detekčním zásobníku byl tříelektroodový systém sestávající z platinové pomocné elektrody, referenční elektrody Ag/AgCl a pracovní diskové uhlíkové elektrody. Předmětem výzkumu byla optimalizace analytických podmínek. Experiment se prováděl v 18 mmol/l boraxovém pufru o hodnotě pH 10,2 při separačním napětí 2000 V.

R. Hamoudová a kol. [99] se snažili využít on-line kombinaci kapilární zónové elektroforézy (CZE) s kapilární izotachoforézou pro separaci a kvantifikaci určených fenolických kyselin a flavonoidů nacházejících se v květech a listech třezalky tečkované. Jako vedoucí elektrolyt v před separačním kroku pro izotachoforézu byl zvolen 10 mmol/l HCl s Tris (trisaminomethanem) jako protiiontem (pH 7,2). Koncový elektrolyt sestával z 50 mmol/l kyseliny borité o pH 8,2 (upraveno hydroxidem barnatým). Základní elektrolyt se skládal z 25 mM β-hydroxy-4-morfolinpropansulfonové kyseliny, 50 mmol/l-Tris, 65 mmol/l kyseliny borité, pH=8,3. Obsah methanolu v elektrolytech byl 20 % v:v.

Analýza hypericinu a hyperforinu pomocí CZE byla provedena metodou nevodné kapilární elektroforézy s minimem modifikací [100]. Pro separaci byla použita křemíková kapilára (75 μm i.d.). Základní elektrolyt se skládal z methanolu, dimethylsulfoxidu, N-methyl formamidu (3:2:1 v/v/v) jako rozpouštědlo, s 50 mmol/l octanem amonným 150 mM octanem sodným a 0,02% (w/v) kationovým polymerem hexadimethrine bromid k obracení toku.

2.3.3 Kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC; UHPLC) představuje jednu z nejvíce používaných analytických metod v oblasti kvalitativního a kvantitativního zkoumání rostlinných materiálů. Mimo značné selektivity a účinnosti je však potřeba zmínit i důraz na vyšší ekonomickou a časovou náročnost. V případě omezení isokratickou elucí může být problémem separovat látky s rozdílnou polaritou. Právě HPLC je pro svůj potenciál vhodná analytická metoda pro analýzu širokého spektra látek obsažených v třezalce [88].

Pomocí HPLC s fluorometrickým detektorem byl analyzován hypericin v alkoholických extraktech a nápojích [101]. K přípravě vzorků byl použit 1 g alkoholického nápoje nebo fytoterapeutické tinktury, poté byl smíchán s methanolem v poměru 1:25 pro tinktury a 1:5 pro alkoholické nápoje. Vzorky byly potom přefiltrovány přes GV₁₃ Millex filter. Pokud byly vzorky uchovávány při teplotě -18 °C, byly stabilní po dobu 2 týdnů. Ke chromatografické analýze byla použita kolona C₁₈ (3 μm) (reverzní fáze 8,3x0,4 cm I.D.). Kolona byla udržována při teplotě 50 °C. K eluci byly použity dvě směsi eluentů: mobilní fáze A sestávala z fosfátového pufru (pH 7) a methanolu (3:7, v:v); mobilní fáze B sestávala z vody a methanolu (3:7, v/v). Vlnová délka detektoru byla 470 nm pro excitaci a 590 nm pro emisi. Analýza trvala celkem 30 minut a retenční čas hypericinu byl okolo 9 minut. Kvantitativní vyhodnocení bylo pomocí lineární regrese přímky, ke sestavení kalibrační přímky byly použity kalibrační roztoky o koncentraci 0,05–3,2 mg/kg. Ve fytoterapeutických extraktech se koncentrace hypericinu pohybovala v rozmezí 9,1–12,5 mg/kg, v alkoholických nápojích byl obsah hypericinu nižší než LOQ.

Seyis a kol. se zabývali analýzou účinných látek obsažených v třezalce tečkované (*Hypericum perforatum*) pomocí HPLC, SPME (mikroextrakce na pevné fázi) a GC [102]. Vzorky rostlin pocházely z Turecka a byly sesbírány v různých nadmořských výškách (391–2210 m.n.m.), rostliny se poté sušily při pokojové teplotě. Usušené vzorky rostlin byly mechanicky homogenizovány na prášek, poté probíhala extrakce 0,1 g tohoto prášku v 10 ml methanolu v ultrazvuku (60 min při 40 °C). Připravený extrakt byl přefiltrován skrz membránový filtr o porozitě 0,22 μm. Separace flavonoidů a fenolických kyselin probíhala na koloně RP-18 (5 μm, 250 mm x 4 mm). Mobilní fáze se skládala z ethylacetátu, vodného roztoku 0,1 M dihydrogenfosforečnanu sodného (pH 2) a methanolu

(39:41:160, v:v:v). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a teplota kolony byla 40 °C. Detektor diodového pole (DAD) byl nastaven na 207 a 589 nm.

Metoda HPLC s gradientovou elucí byla použita pro stanovení sekundárních metabolitů (flavonoidy, naftodiantrony atd.) v třezalce tečkované [103]. Pro analýzu byly sesbírány tříleté rostliny, které byly následně sušené v temné místnosti při pokojové teplotě. Vzorek rostliny pro analýzu byl připraven z 0,5 g namletého rostlinného materiálu a 10 ml methanolu, poté byl vzorek extrahován pomocí magnetické míchačky nebo ultrazvuku po dobu 15 minut. Poté byl vzorek centrifugován, a filtrován. Zbylá sedlina byla re-extrahována stejnou cestou. Vzorky rostlinných léčivých produktů a doplňků stravy byly připraveny navážením 0,5 g práškového materiálu (z 10 nadrcených tablet nebo z obsahu 10 kapsulí), extrakční procedura byla stejná jako u předchozího vzorku. Všechny extrakty byly přefiltrovány přes 0,45 µm PTFE filtr. Chromatografická separace probíhala na koloně HS PEG (150 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm). Použita byla gradientová eluce, mobilní fáze se skládala ze (složky A) 0,1 mol/l octové kyseliny a (složky B) methanol-acetonitril (5:4, v:v). Detekce probíhala na UV-VIS detektoru při vlnových délkách 270 nm (pro chlorogenovou kyselinu, flavonoidy a floroglucinoly) a 590 nm (pro naftodiantrony).

Metodologické aspekty kvantifikace biologicky aktivních látek rodu *Hypericum* byly sledovány nahromaděním sekundárních metabolitů dvou druhů třezalek (*H. perforatum* a *H. annulatum*) v listech a stoncích, a dále byl porovnáván obsah metabolitů při použití různých extrakčních činidel (80 % methanol nebo 60 % ethanol). Rostlinný materiál byl sušen po dobu 3 hodin při 60 °C, poté byl namlet na prášek. Prášek z 250 mg suchého materiálu byl extrahován třikrát čerstvou dávkou 80 % methanolu nebo 60 % ethanolu v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut a při teplotě 40 °C. Získané extrakty byly centrifugovány a směs všech tří supernatantů byla přefiltrována přes 0,22 µm filtr. Primární extrakty byly zředěny pětkrát příslušným rozpouštědlem (250 mg usušeného materiálu v 25 ml). Roztok pro analýzu sestával z 30 µl extraktu, 470 µl redestilované vody, 975 µl 2% Na₂CO₃ a 25 µl Folin-Ciocalteu činidla. Pro analýzu hyperforinu a hypericinu pomocí HPLC byla zvolena kolona RP18 (10 cm x 4,6 mm i.d., 2,6 µm velikost částic), směs acetonitrilu s 0,025 % trifluoroctovou kyselinou a 200 mmol/l amonium acetátového vodného roztoku (70:30 v/v) jako mobilní fáze, průtok byl udržován na 1 ml/min. Pro detekci byl použit DAD (190-700 nm) [100].

Byla vytvořena robustní metoda pro kvantifikaci hypericinů (hypericin, pseudohypericin, protohypericin, protopseudohypericin) a jejich prekurzorů (emodin a skyrin) v živých kulturách třezalky tečkované [104]. *In vitro* byly extrahovány výhonky třezalky tečkované. Analýza byla prováděna pomocí UPLC systému se spektrometrickým/fluorescenčním detektorem pro kvantifikaci. Byla použita kolona (BEH C18 2,1x100 mm, 1,7 μm), byla použita binární mobilní fáze skládající se z A: 10 mmol/l acetátu amonného okyseleného 0,1 % kyselinou mravenčí; B: acetonitril/methanol (80:20, v:v).

Byly porovnávány metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s vysokým rozlišením pro stanovení hypericinu za různých chromatografických podmínek. Dalším předmětem zkoumání byl vliv extrakce na množství vyextrahovaného hypericinu. K extrakci byly použity dvě metody a to: extrakce za asistence xylenásy a mikrovlnná extrakce. Při kombinaci těchto dvou metod došlo k nárůstu výtěžku extrakce oproti extrakci bez asistence. Pro HPLC analýzu byla použita kolona C18 (250 x 4,6 mm, velikost částic 5 μm). Optimální mobilní fáze sestávala z methanolu, acetonitrilu, 0,1 mol/l dihydrogenfosforečnanu sodného (2:3:1 v:v:v). UV-VIS detektor byl nastaven na vlnovou délku 590 nm [105].

K. Zeliou a kol. [94] se zaměřili na vyvinutí moderní validační HPLC metody pro analýzu extraktů a produktů (infúze, tablety) třezalky tečkované pro přesnou kvantifikaci hlavních komponent třezalky (fenolické kyseliny, flavonoidy, naftodiantrony a floroglucinoly). Extrakty byly připraveny pomocí macerace 5 g suchého materiálu třezalky v methanolu a zkoncentrovány sušením ve vakuu při 30°C. HPLC systém pro analýzu se skládal z DAD detektoru (590 nm pro naftodiantrony). Kolona C18 (250x4,6 nm, i.d. 5 μm) s předkolonkou byla vyhřívána na 30°C. Mobilní fáze sestávala z octanu amonného (pH 4,5; 10 mmol/l), acetonitrilu a methanolu v objemovém poměru určeném gradientem. Látky byly kvantifikovány pomocí metody vnějšího standardu s využitím kalibrační křivky pro každou látku zvlášť.

Pro porovnání chemického složení *Hypericum perforatum* a *H. maculatum* v Estonsku byl použit systém HPLC-DAD-MS. Sušené rostliny byly extrahovány v methanolu (1:20 w:v) za nepřístupu světla při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Extrakty byly před nástřikem do systému přefiltrovány a centrifugovány [106].

2.3.4 Elektrochemické metody

Tyto metody lze využít pouze pro elektrochemicky aktivní látky. V třezalce tečkované je přítomno hned několik elektrochemicky aktivních látek (např. hypericin, pseudohypericin, hyperforin a flavonoidy). Při obsahu více elektrochemicky aktivních látek ve směsi, kterou chceme analyzovat, je důležité použít vhodnou separační metodu ve spojení s elektrochemickou metodou. Pomocí separační metody dojde k rozdělení směsi na jednotlivé komponenty, které lze snáze analyzovat. Pro separaci mohou být využity elektromigrační metody (např. kapilární elektroforéza s wall-jet amperometrickou detekcí [98]) nebo chromatografické metody (např. HPLC-ECD [107]-[110]). Kromě spojení se separačními metodami, lze bylinné extrakty z třezalky analyzovat i samostatnými elektrochemickými metodami, jako je např. diferenčně pulzní voltametrie [111]. Přestože se zdá být výhodné použití elektrochemických metod při analýze elektroaktivních látek třezalky tečkované, v literatuře lze najít pouze omezený počet údajů o jejich využití.

3 Experimentální část

3.1 Instrumentální vybavení

HPLC systém se skládal ze Shimadzu LC-10AD isokratické pumpy (SHIMANDZU, Japonsko) s tlumičem pulsů, manuálního dávkovače vybaveného 20 μ l smyčkou Rheodyne (Rheodyne, Cotati, CA, USA). Jako elektrochemické detektory byly použity ESA amperometrický detektor (Model 5040) vybavený bórem dopovanou diamantovou elektrodou a ESA coulometrický detektor III s dvouelektrodovou standardní analytickou celou (Model 5010 A) v kombinaci s guard celou (Model 5020) umístěnou před dávkovačem (všechny ESA Inc., Chelmsford, MA, USA). Jako spektrofotometrický detektor byl použit UV-VIS detektor Shimadzu SPD 10-A VP (Shimadzu, Duisburg, Německo). Byly použity kolony s reverzními fázemi C18 5 μ m, 250 mm x 2,1 mm I.D. (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a C8 5 μ m, 250 mm x 2,0 mm I.D. (Macherey-Nagel, Düren, Německo). Všechny části přístroje byly spojeny pomocí PEEK kapilár. Pro nahrávání chromatografických dat byl použit software Clarity (DataApex, Praha, Česká republika). Vzorokly byly vpravovány do systému pomocí skleněné 250 a 25 μ l stříkačky (Hamilton, Reno, NV, USA).

Voltametrické experimenty byly realizovány na Eco-Tribo polarografu (Polaro-Sensors, Praha). Pro nahrávání voltametrických dat byl použit software PolarPro verze 4.

3.2 Chemikálie

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

3.3 Vzorky tinktur

- Třezalka tečkovaná – tinktura z byliny (výrobce: Mgr. Jarmila Podhorná Naděje)
- Třezalka – bylinné kapky (výrobce: Valdemar Grešík)
- Třezalka – tinktura z pupenů (výrobce: Serafín)

Všechny zakoupené komerční tinktury byly vyrobené na území České republiky.

3.4 Pracovní postupy

Příprava pufru

Pufir byl připraven přesným navážením odpovídajícího množství NaH_2PO_4 a rozpuštěním ve vodě pro HPLC. Na požadovanou hodnotu pH byl pufir upraven pomocí zředěné kyseliny fosforečné. Takto připravený pufir byl následně vakuově přefiltrován přes mikrofiltr o velikosti pórů 0,2 μm . Pokud není uvedeno jinak, tak se ve většině měření jako pufir používal 25 mmol/l fosfátový pufir o pH=3.

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smícháním odpovídajících objemů potřebných rozpouštědel. Po smíchání byla mobilní fáze odplyněna za pomoci helia nebo ultrazvuku.

Příprava standardu a skladování standardu

Standard hypericinu byl připraven rozpuštěním 1 mg standardu v 1 ml ethanolu ($c=1$ mg/ml). Z tohoto standardu bylo odpipetováno 100 μl a doplněno na 1 ml ethanolem ($c=0,1$ mg/ml). Pro měření se odebralo ze standardu s $c=0,1$ mg/ml 100 μl , a k němu byla přidáno 100 μl pufru o pH=3 ($c=0,05$ mg/ml). Standard o $c=1$ mg/ml byl skladován v mrazáku při teplotě -75 °C. Standard o $c=0,1$ mg byl skladován v mrazáku při teplotě -18 °C. Pracovní standard o $c=0,05$ mg/ml byl skladován taktéž v mrazáku při teplotě -18 °C.

Příprava vzorků tinktur pro HPLC analýzu

Vzorke tinktur byly nejprve přefiltrovány přes diskový filtr. Poté byly vzorke tinktur ředěny vodou, vždy jeden díl tinktury byl ředěn stejným dílem vody. Vznikl tak 50 % roztok tinktury. Takto připravený roztok byl nastříknut do systému HPLC.

Sběr květů a rostliny a jejich zpracování

Pro identifikaci rostliny byly využity dostupné informace jak na internetu, tak v atlasu květeny České republiky. Pro ujištění, že se jedná o správnou rostlinu, byl proveden test, kdy mezi prsty byl třen květ třezalky a pokud se jednalo o třezalku, tak se na prstu objevilo černé zbarvení. Rostliny byly sbírány ve třech termínech a to: 05. července, 11. srpna a 06. září 2021. Rostliny byly sbírány pouze za jasného dne v ranních hodinách. Mezi nejčastějšími místy výskytu byly mýtiny nebo okraje lesa. Všechny rostliny byly sesbírány v okolí Varnsdorfu v nadmořské výšce přibližně 400 m. n. m..

Rostliny byly po sesbírání několik hodin ponechány na slunci, aby se zbavily ranní rosy. Poté byly rostliny zbaveny nečistot a svázané do snopků, které byly pověšeny ve stinné místnosti. Sušení probíhalo za pokojové teploty.

Příprava a výroba vlastní tinktury

Čerstvě natrhané květy třezalky tečkované (asi 10 g) byly dány do reagenční láhve, dále ke květům bylo přilito 200 ml 50 % ethanolu. Takto připravená směs pro maceraci byla ponechána 8 týdnů ve tmě při pokojové teplotě. Po uplynutí byla provedena dekantace do lahvičky s tmavým sklem.

Výpočet kapacitního faktoru

Kapacitní faktor (k) určuje zadržení látky na koloně. Je ovlivněn stacionární fází, mobilní fází a teplotou. Obecně čím je kapacitní faktor vyšší, tím získáváme lepší rozlišení (optimální k je 2-8). Je určen poměrem redukovaného retenčního času (t'_R) a mrtvého času (t_M). Redukovaný retenční čas byl získán z rozdílu retenčního času (t_R) a mrtvého času.

$$t'_R = t_R - t_M \qquad k = \frac{t'_R}{t_M}$$

Voltametrické experimenty

Před začátkem měření byl povrch pracovní elektrody leštěn pomocí suspenze aluminy nanesené na navlhčenou textilií. Pak byl povrch elektrody opláchnut destilovanou vodou ze stříčky. Jako pracovní elektroda byla použita elektroda ze skelného uhlíku, argenchloridová elektroda posloužila jako referentní elektroda, pomocnou elektrodu tvořil platinový drátek. Skenovací rozsah činil -500 až 1800 mV a rychlost skenu pro cyklickou

voltametrii i pro voltametrii se čtvercovou vlnou (square-wave voltametrie) byla 100 mV/s. Byly registrovány dva opakované cykly.

Pro voltametrická stanovení byl použit standard hypericinu ($c=0,05$ mg/ml), ve kterém byl přítomen fosfátový pufr. Základní elektrolyt (ZE) byl tvořen ethanolem a pufr (50:50, v:v). Všechna voltametrická měření byla prováděna ve voltametrické nádobce pro měření malých objemů s fritou.

Studium kinetiky fotodegradace

500 mg sušené rostliny bylo naváženo do reagenční lahve, která byla obalena hliníkovou fólií kvůli zabránění slunečnímu záření. Poté bylo do reagenční lahve přilito 20 ml extrakční směsi (16 ml ethanolu + 4 ml vody). Lahev byla umístěna do ultrazvuku na 20 minut. Výsledný extrakt byl přefiltrován přes diskový filtr do průsvitných skleněných vialek. Všechny tyto operace probíhaly za nepřístupu světla. Z vialek byl odebrán bod 0 a následně vialky byly umístěny na parapet okna (za krásného bezmračného počasí) a pod UV lampu (nastavená vlnová délka činila 365 nm). Z vialek bylo za každé časové období odpipetováno 250 μ l extraktu, ke kterému bylo napipetováno stejné množství vody, a následně byl roztok umístěn do tmy. Všechny odebrané části byly následně zanalyzovány pomocí HPLC ve spojení s UV-VIS a elektrochemickým detektorem.

3.5 Chromatografické podmínky

Nastavení pro systém HPLC: průtok mobilní fáze 0,3 ml/min, mobilní fáze ACN : methanol : fosfátový pufr (45:30:25, v:v:v) (pro analýzy v kap. 4.3, 4.4, 4.5, 4.6) a ACN:fosfátový pufr (70:30, v:v) (pro analýzy v kap. 4.1 a 4.2), kolony s reverzními fázemi C18 5 μ m, 250 mm x 2,1 mm I.D. (pro analýzy v kap. 4.1 a 4.2) a C8 5 μ m, 250 mm x 2,0 mm I.D. (pro analýzy v kap. 4.3, 4.4, 4.5, 4.6), objem nástřiku 10 μ l (prováděn manuálně), separace probíhala za pokojové teploty.

Detekční podmínky: vlnová délka 590 nm, deponovaný potenciál na pracovní elektrodě 800 mV (vs. Pd/H₂), proudový rozsah 20-100 nA/V.

Dále byla pro všechna měření využívána guard cela s nastaveným potenciálem 800 mV, která byla připojena před nástřikem.

Pokud není uvedeno jinak, byly pro všechny analýzy použity výše uvedené podmínky.

4 Výsledky a diskuse

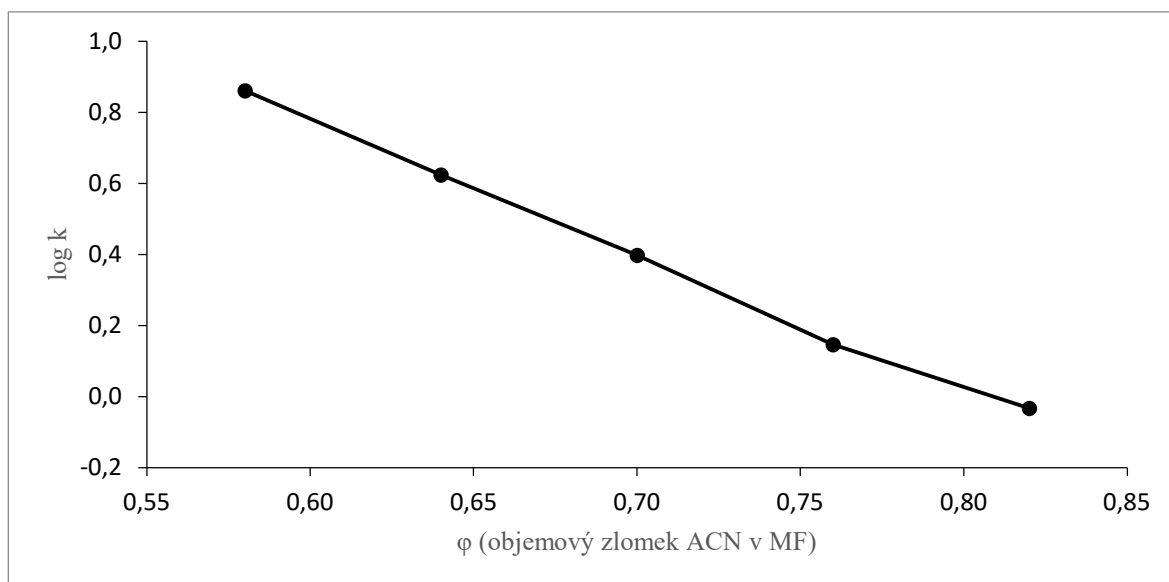
4.1 Optimalizace podmínek pro separaci

Před analýzou reálných vzorků a kvantifikací hypericinu byl studován vliv jednotlivých chromatografických parametrů (složení mobilní fáze, stacionární fáze, pH pufru a teplota) na separaci hypericinu.

4.1.1 Vliv složení mobilní fáze

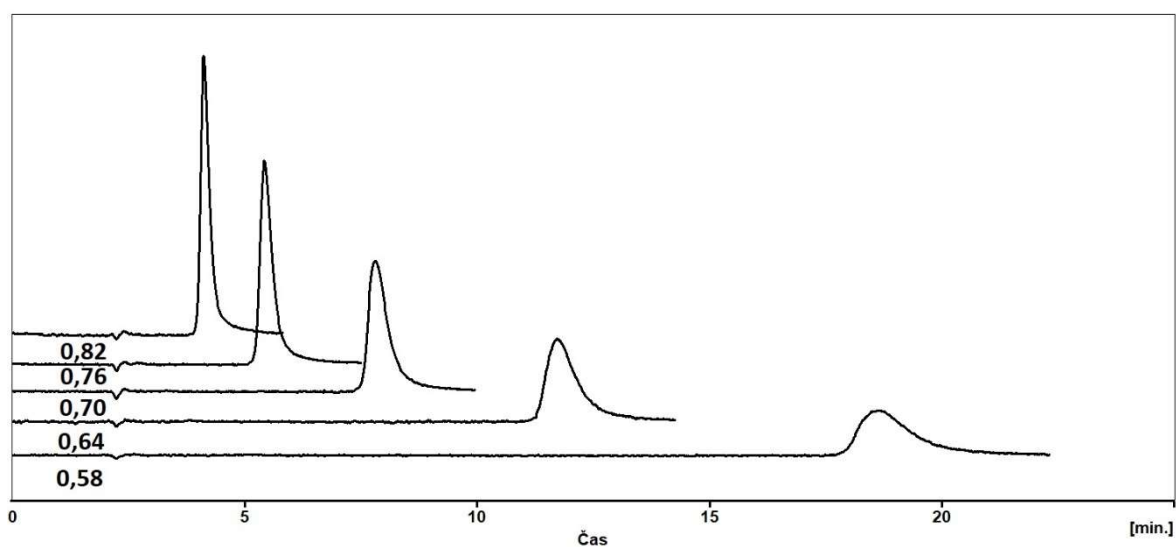
Byl studován pouze vliv organického modifikátoru na separaci hypericinu. Jelikož ve všech případech byl používán fosfátový pufr o dostatečné čistotě, nebyl proto zkoumán vliv i jiných anorganických iontů. Z organických rozpouštědel byl studován methanol (MeOH), acetonitril (ACN) a ternární mobilní fáze z obou rozpouštědel.

Pro zjištění optimálního obsahu organického modifikátoru byly studovány různé objemové zlomky (φ) ACN v mobilní fázi (0,58; 0,64; 0,70; 0,76; 0,82). Do grafu byla vynesena závislost logaritmu kapacitního (nebo též retenčního) faktoru ($\log k$) na obsahu ACN v mobilní fázi.



Obr. 6 - Vliv podílu acetonitrilu na logaritmus kapacitního faktoru hypericinu

Na **Obr. 6** lze vidět vliv obsahu ACN na kapacitní faktor. Postupně se snižujícím se množstvím acetonitrilu zvyšoval logaritmus kapacitního faktoru. Dle očekávání docházelo s rostoucím kapacitním faktorem i k rozšiřování píku hypericinu, jak můžeme vidět na **Obr. 7**. Kromě sledování dopadu množství ACN na tvar a symetrii píku, musela být brána v potaz i separace reálných vzorků. Z tohoto důvodu byla provedena kontrolní analýza alkoholického extraktu s cílem posoudit separaci ostatních komponent ve vzorku.



Obr. 7 - Vliv objemového zlomku (φ) ACN na separaci hypericinu

Dalším studovaným organickým rozpouštědlem byl methanol. Přestože byla provedena série experimentů s různým obsahem methanolu, nebyl dosažen uspokojivý výsledek analýzy, proto bylo od využití methanolu v binární mobilní fázi upuštěno.

S cílem sledovat vliv selektivního příspěvku methanolu, který byl přidáván jako část frakce do ternární mobilní fáze, byla vyzkoušena mobilní fáze ve složení ACN:MeOH:fosfátový pufr. Kde se postupně snižoval objem ACN, a zároveň se zvyšoval objem methanolu, tak aby celkový obsah organické fáze zůstal stejný. Byly postupně vyzkoušeny tři mobilní fáze o složení ACN:MeOH:fosfátový pufr (65:10:25, 55:20:25, 45:30:25, v:v:v).

ACN (%)	MeOH (%)	fosfátový pufr (%)	k
65	10	25	2,11
55	20	25	5,47
45	30	25	7,92

Tab. I - vliv složení ternární mobilní fáze na kapacitní faktor

Mimo čistě binárních směsí byla vyzkoušena ternární mobilní fáze z důvodu vylepšení separace při analýze reálných vzorků. Při současně prováděné kontrole reálných vzorků byla pozorována lepší diferenciací píků na začátku analýzy. Tento fakt byl důležitý nejen pro analýzu reálných vzorků, ale také pro následně prováděné studium kinetiky fotodegradace (viz 4.6). Pro tyto účely byla použita mobilní fáze o složení ACN:MeOH:fosfátový pufr (45:30:25, v:v:v).

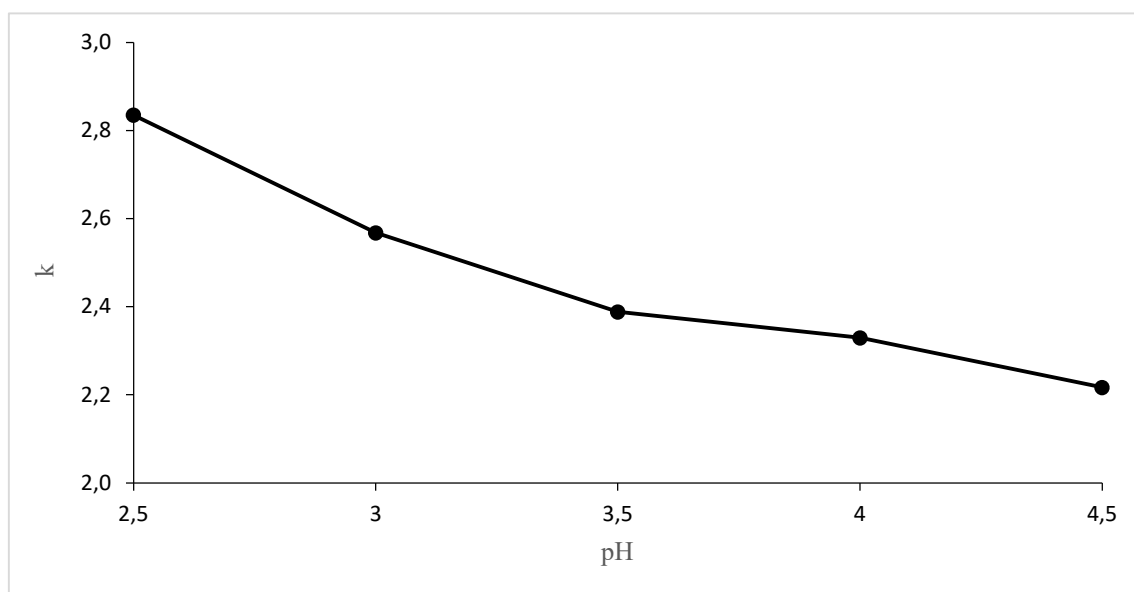
Dále bylo pozorováno, že dochází k rozšiřování píků, díky vzorkům v solventu s dostatečně velkou eluční silou (ethanol). Z tohoto důvodu byly vzorky a extrakty ředěny vodou (1:1). Tento krok vedl k zúžení píků.

4.1.2 Porovnání typu sorbentu stacionární fáze

Použitý typ stacionární fáze (C18) je charakteristický tím, že výrazně diverzifikuje látky na základě rozdílné polariry, což může být nevýhodou při analýze komplexních směsí látek. Tato skutečnost má za následek delší dobu analýzy, zvláště při analýze reálných vzorků. Z tohoto důvodu byl testován vliv selektivity C8 stacionární fáze místo používané C18. Při zkrácení alkylového řetězce stacionární fáze došlo ke snížení doby analýzy beze změny účinnosti separace. Proto byla kolona C8 použita pro analýzu reálných vzorků.

4.1.3 Vliv pH pufru na separaci

Dalším krokem optimalizace separace bylo studium vlivu pH pufru na separaci. Postupně při tomto experimentu byla testována sada pufrů o pH: 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5.

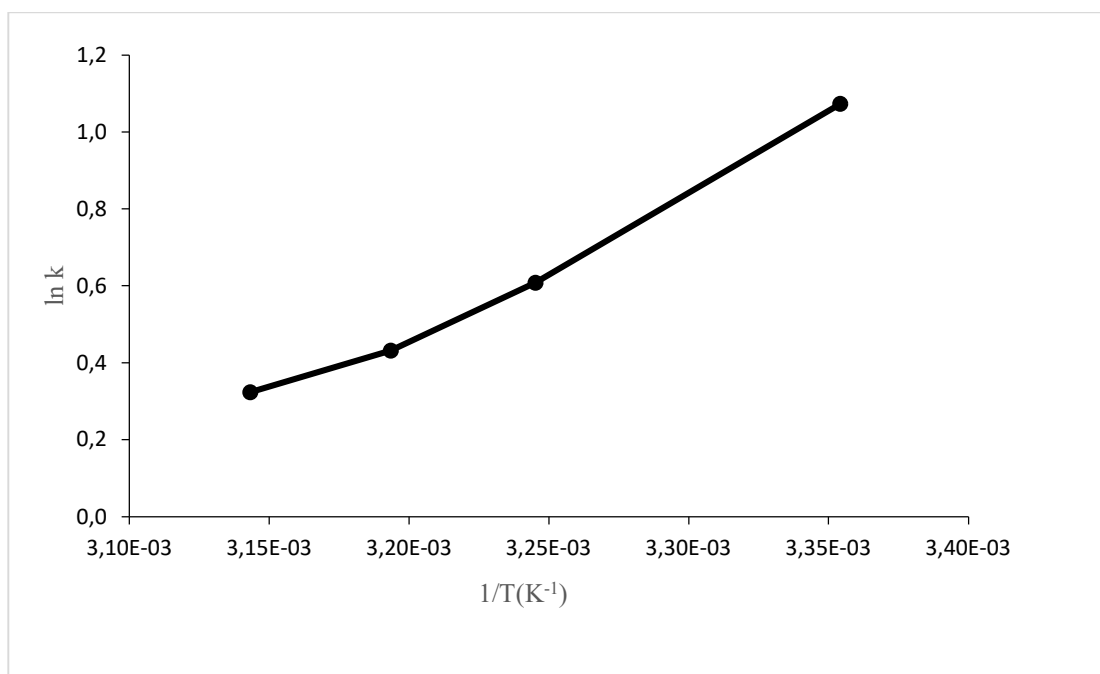


Obr. 8 - Vliv pH pufru na kapacitní faktor hypericinu

Na **Obr. 8** je vidět vliv pH pracovního pufru na kapacitní faktor. Z grafu vyplývá, že s klesajícím pH roste kapacitní faktor. Z toho lze usuzovat slabě kyselý charakter hypericinu. Všechny hodnoty pH se z hlediska kapacitního faktoru jevily jako vhodné. Vzhledem k doporučenému pH rozsahu kolony (2-10) bylo pro další experimenty zvoleno pH=3.

4.1.4 Vliv teploty na separaci

Je známo, že teplota má vliv na termodynamiku a kinetiku chromatografické separace. Tímto experimentem byl zkoumán vliv teploty kolony na retenci standardu hypericinu. Postupně byly proměřeny čtyři hodnoty teploty (25, 35, 40 a 45 °C). Při tomto experimentu byla kolona umístěna do termostatu, který byl temperován na příslušnou teplotu. Při každé změně teploty termostatu se vyčkalo minimálně 30 minut, aby byla dosažena tepelná ekvilibrace kolony. V následujícím grafu (**Obr. 9**) je uvedena závislost přirozeného logaritmu kapacitního faktoru ($\ln k$) na reciproké hodnotě termodynamické teploty T^{-1} .



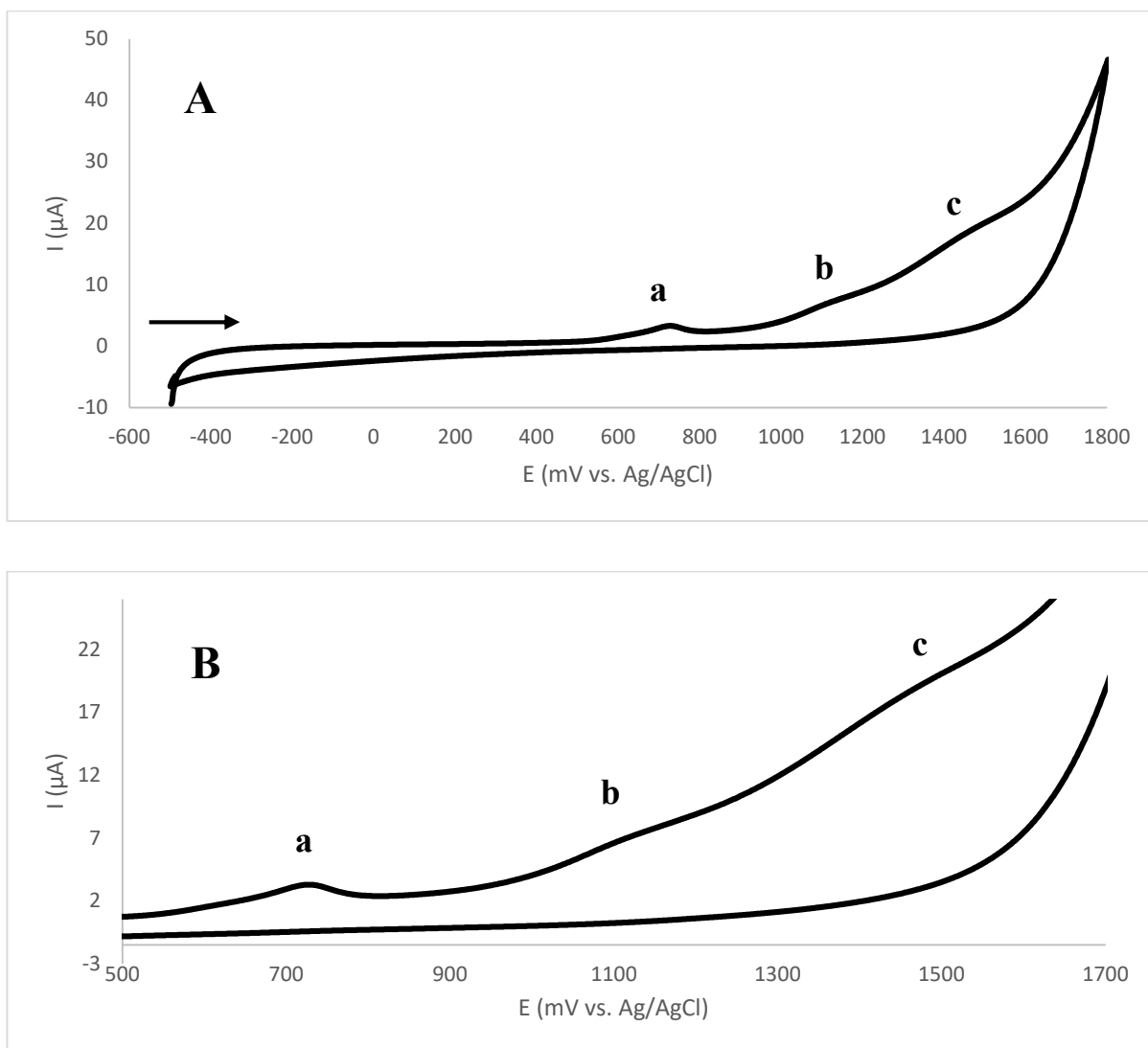
Obr. 9 – Závislost přirozeného logaritmu na teplotě kolony

Z **Obr. 9** můžeme vidět, že se vzrůstající teplotou dochází ke snižování přirozeného logaritmu kapacitního faktoru. Z kinetického hlediska by se vzrůstající teplotou měl být chromatografický systém účinnější. Pro zjednodušení experimentálního uspořádání, kdy vyšší teploty nepřinášeli zlepšení separace, byla zvolena pokojová teplota pro další analýzy.

4.2 Elektrochemická charakterizace hypericinu

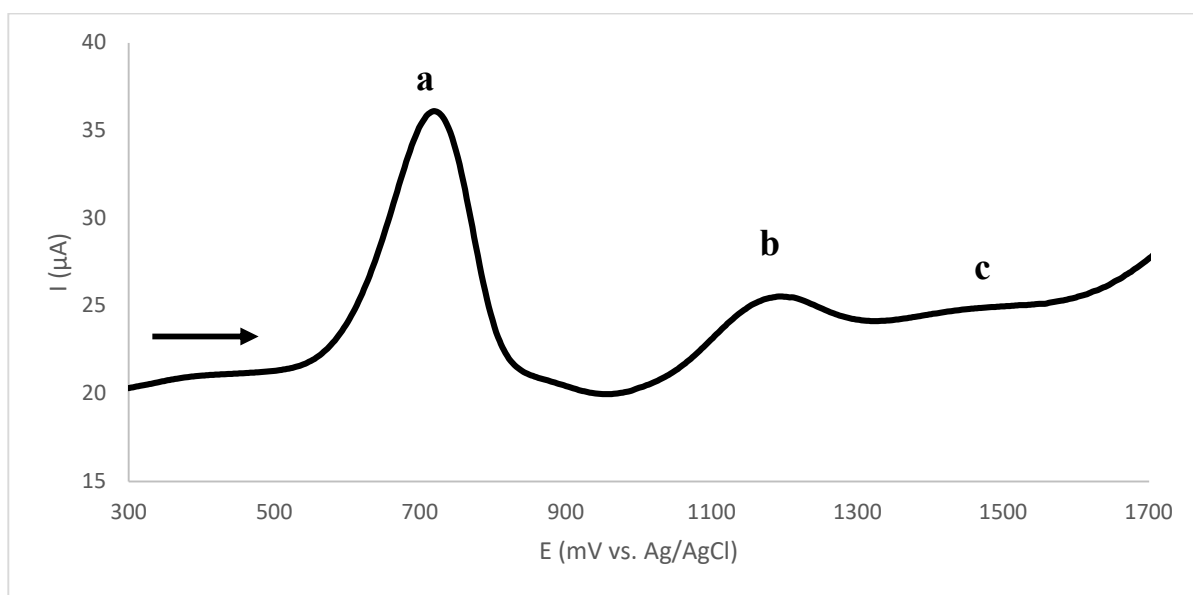
Pro určení vhodného pracovního potenciálu bylo nutné provést řadu experimentů. Kromě sestavení hydrodynamických voltamogramů (HDV) byl hypericinu elektrochemicky charakterizován i pomocí voltametrie (cyklická a square-wave).

Na **Obr. 10A** (výřez **Obr. 10B**) je zobrazen cyklický voltamogram hypericinu. V analytické oblasti jsou evidentní tři signály (první při 700 mV, druhý při 1100 mV a třetí při 1500 mV vs. Ag/AgCl). Při obráceném katodickém skenu se neobjevil žádný signál.



Obr. 10 A,B - Cyklický voltamogram hypericinu $9,9 \cdot 10^{-5}$ mol/l, (a, b, c) signál analytu, rychlost skenu=100 mV/s, ZE: 50 % fosfátového pufr a 50 % ethanolu (v:v)

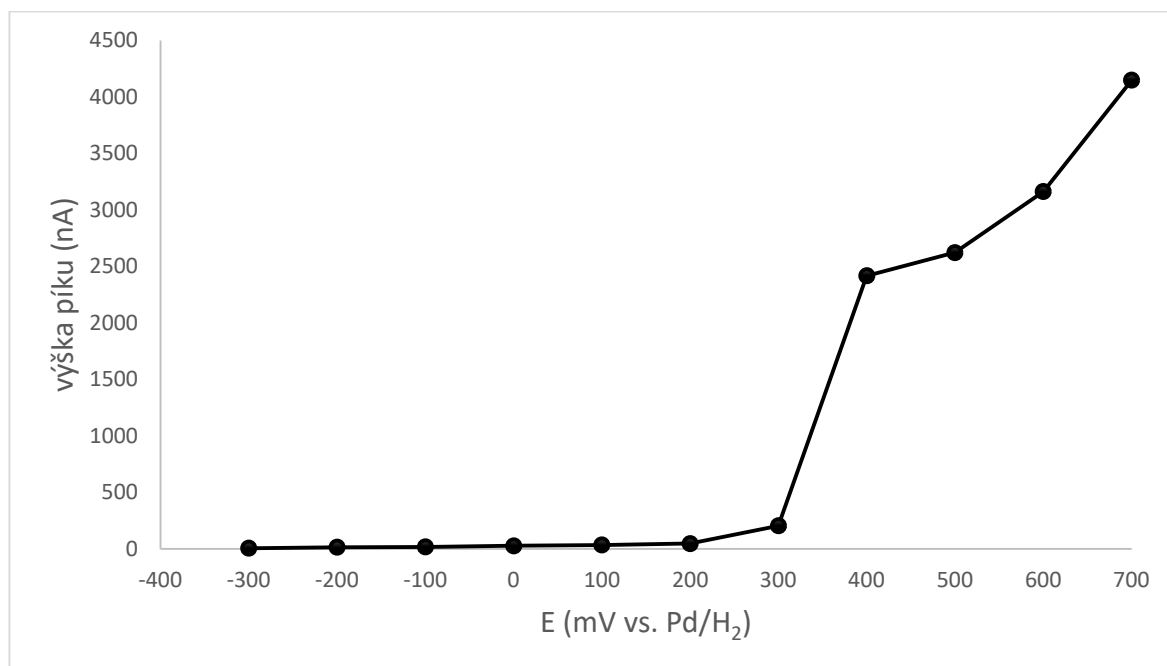
Experimenty v klasickém elektrochemickém uspořádání jsou náročné na dostatečnou koncentraci analytu (řádově 1 mmol/l). V mém případě jsem byl limitován malým množstvím standardu rozpuštěného v ethanolu, který musel být pro elektrochemické experimenty ještě dále ředěn fosfátovým pufrům, aby byla zajištěna dostatečná vodivost. Z tohoto důvodu byla provedena square-wave voltametrie, která je zpravidla citlivější a mohla by tak vhodnější pro analýzu málo koncentrovaných analytů.



Obr. 11 – Square-wave voltamogram pro hypericin $9,9 \cdot 10^{-5}$ mol/l, (a, b, c) signál analytu, rychlost skenu=100 mV/s, ZE: 50 % fosfátového pufr a 50 % ethanolu (v:v)

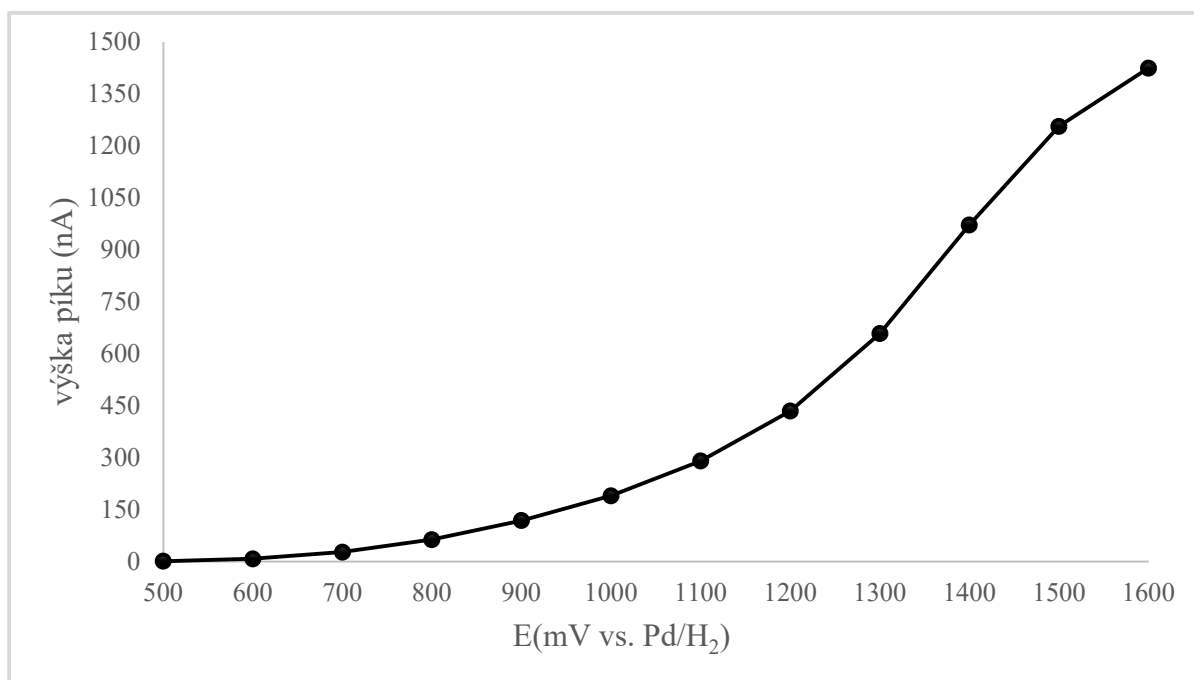
Na square-wave voltamogramu (**Obr. 11**) lze vidět tři signály při potenciálech 700, 1100 a 1500 mV vs. Ag/AgCl.

Vhodný pracovní potenciál pro experimenty s elektrochemickým detektorem (ECD) byl zjišťován pomocí hydrodynamických voltamogramů. Byly sestrojeny dva HDV na různých elektrodových materiálech (tenkovrstvá BDD a porézní grafitová elektroda). HDV je vyjádřen jako závislost protékajícího proudu měrnou celou (v našem případě je vynášena výška píku) na vkládaném pracovním potenciálu (vs. Pd/H₂).



Obr. 12 - Hydrodynamický voltamogram hypericinu

Obr. 12 znázorňuje HDV naměřený pomocí porézní grafitové elektrody. Prvním bodem voltamogramu je potenciál -300 mV, při nižších potenciálech nedocházelo k oxidaci standardu hypericinu. Postupně byl pracovní potenciál navyšován po 100 mV až do potenciálu 700 mV. Pro potenciály -300 až 300 mV byla zvolena citlivost 500 nA/V a pro potenciály 400 až 700 mV byl proudový rozsah 5 μ A/V.



Obr. 13 - Hydrodynamický voltamogram hypericinu (tenkovrstvá BDD elektroda)

Obr. 13 představuje HDV hypericinu sestavený pomocí tenkovrstvé BDD elektrody. Jako počáteční pracovní potenciál byl zvolen 500 mV, při nižším potenciálu nedocházelo k oxidaci hypericinu. Poté byl potenciál postupně navyšován po 100 mV do potenciálu 1600 mV. Počáteční citlivost (proudový rozsah) činila 1 $\mu\text{A/V}$, při 1300 mV byla citlivost změněna na 5 $\mu\text{A/V}$, a poté při 1600 mV na 10 $\mu\text{A/V}$. Při vyšších pracovních potenciálech bylo pozorováno výrazné rozšiřování chromatografických píků. Z tohoto důvodu byl pro analýzy reálných vzorků zvolen kompromisní potenciál 800 mV, který poskytoval užší píky a nižší šum.

Pro další experimenty byla zvolena amperometrická cela s BDD elektrodou. I když dle očekávání cela s BDD elektrodou poskytovala nižší proudovou odezvu (kvůli menší ploše elektrody), vykazovala však menší sklony k adsorpci látek, což se projevilo užšími píky při analýze reálných vzorků. Na druhou stranu byla po určitém počtu nástřiků (většinou deset) pozorována pasivace elektrody a tím pádem ke snížení odezvy signálu. Je známo, že se BDD elektroda kvůli malému povrchu snáze zaneše depozitem při opakovaných měřeních. Při odhalení pasivace sehrála pozitivní roli duální detekce, kdy pík standardu změřený ECD měl o dost menší výšku oproti předchozím analýzám, avšak výška píku detekovaná pomocí UV-VIS detektoru se výrazně nezměnila.

Pro účely elektrochemického čištění byl vyvinut postup sestávající z aplikace dvou pulzů (1800 a -1000 mV po dobu 5 minut). Aplikace vysokého a nízkého pracovního potenciálu se osvědčila a podařilo se tak obnovit původní odezvu elektrody.

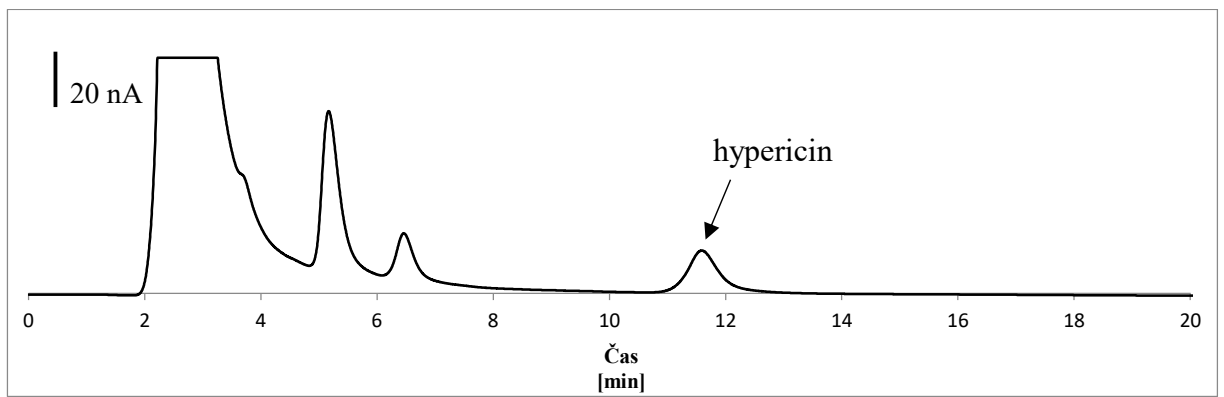
4.3 Separace reálných vzorků

Všechny komerční tinktury spolu s vlastní tinkturou byly z analyzovány za stejných analytických podmínek. Chromatogramy jednotlivých tinktur ukazují, že tinktury jsou si podobné co do obsahu přítomných látek. I když jednotlivé vzorky tinktur mají podobný látkový profil, odlišují se v poměrech účinných látek.

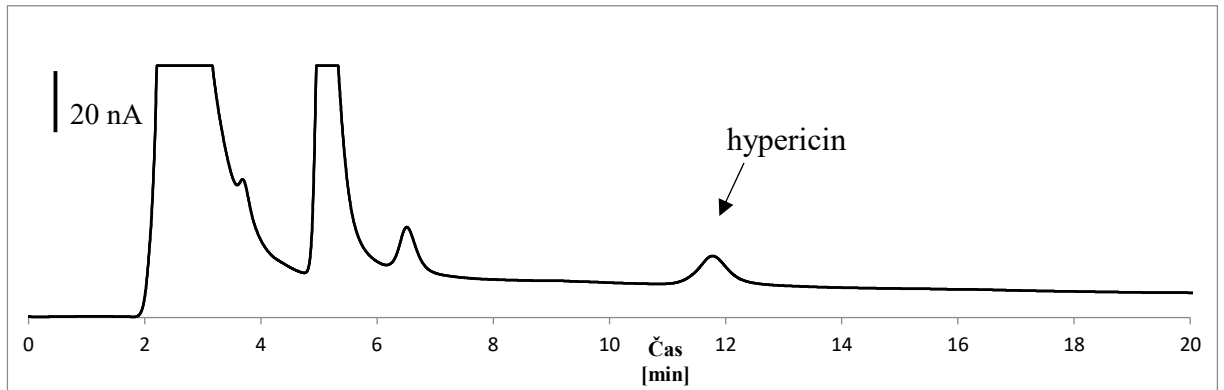
Ze všech tinktur se nejvíce odlišuje tinktura Serafin. Vysvětlením může být, že tato tinktura je vyráběna z jiných částí rostliny. Narozdíl od ostatních tinktur je tinktura Serafin vyrobená z pupenů třezalky tečkované. Právě rostlinný materiál hraje významnou roli při přípravě tinktur. Je známo, že největší množství účinných látek je přítomno ve květech při vrcholném květenství. Pokud byla tinktura připravena z pupenů, obsahy jednotlivých látek mohou být nižší.

Všechny tinktury obsahují jako matrici líh, navzájem se odlišující v objemových procentech alkoholu (37,5-50 %). Největší množství ethanolu obsahovala vlastní tinktura, pro kterou byl použit 50 % ethanol. Co se týče rostlinného materiálu použitého k výrobě tinktury, tak kromě pupenů byl použit květ (Podhorná-Naděje, vlastní tinktura) a nať třezalky tečkované (Grešík).

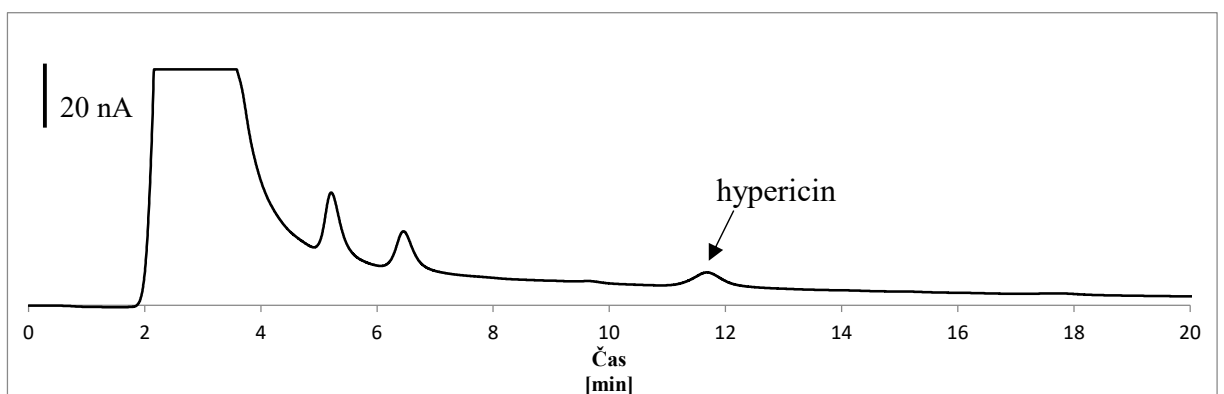
Ve všech případech se podle výrobců jedná o doplněk stravy s obsahem alkoholu. V Evropské unii jsou tyto doplňky stravy regulovány podle Nařízení ES 1924/2006 o zdravotních tvrzeních a 1169/2011 o léčebných tvrzeních. Kvůli těmto nařízením výrobci nemohou podávat informace u přípravků z rostlin o možnostech léčby. U námi koupených tinktur bylo uvedeno na co má třezalka tečkovaná příznivý vliv. Podle výrobců má třezalka uklidňující účinky, napomáhá duševnímu zdraví, harmonizuje spánek, posiluje imunitu nebo přispívá k dobrému trávení. Dále všichni výrobci varují o případném projevení zčervenání a svědivosti kůže, vyvolané fotosenzibilním účinkem. Rovněž zmiňují, že není vhodné užívat přípravky z třezalky tečkované spolu s antidepresivy.



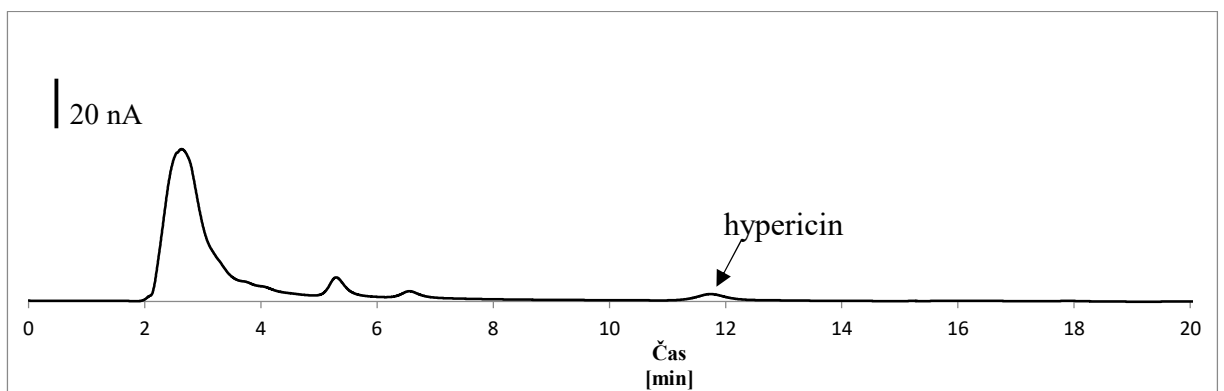
Obr. 14 - Tinktura Podhorná



Obr. 15 - Vlastní tinktura připravená macerací



Obr. 16 - Tinktura Grešík



Obr. 17 - Tinktura Serafin

4.4 Kalibrace, mez detekce, mez kvantifikace

Při kvantitativním vyhodnocení v kapalinové chromatografii je potřeba empiricky pomocí standardů určit vztah mezi naměřenou výškou/plochou píkou a koncentrací analyzované látky. Nejčastějšími metodami kvantitativní analýzy jsou: metoda vnitřního standardu, metoda standardního přídatku, metoda vnitřní normalizace a metoda vnějšího standardu, která se dá provádět pomocí kalibrační křivky. Při této metodě se analyzuje série standardů o známé koncentraci a hledá se závislost kalibrační funkce $X = fK(c)$. Množství analyzované látky se poté určí pomocí analytické vyhodnocovací funkce $c = fA(X)$.

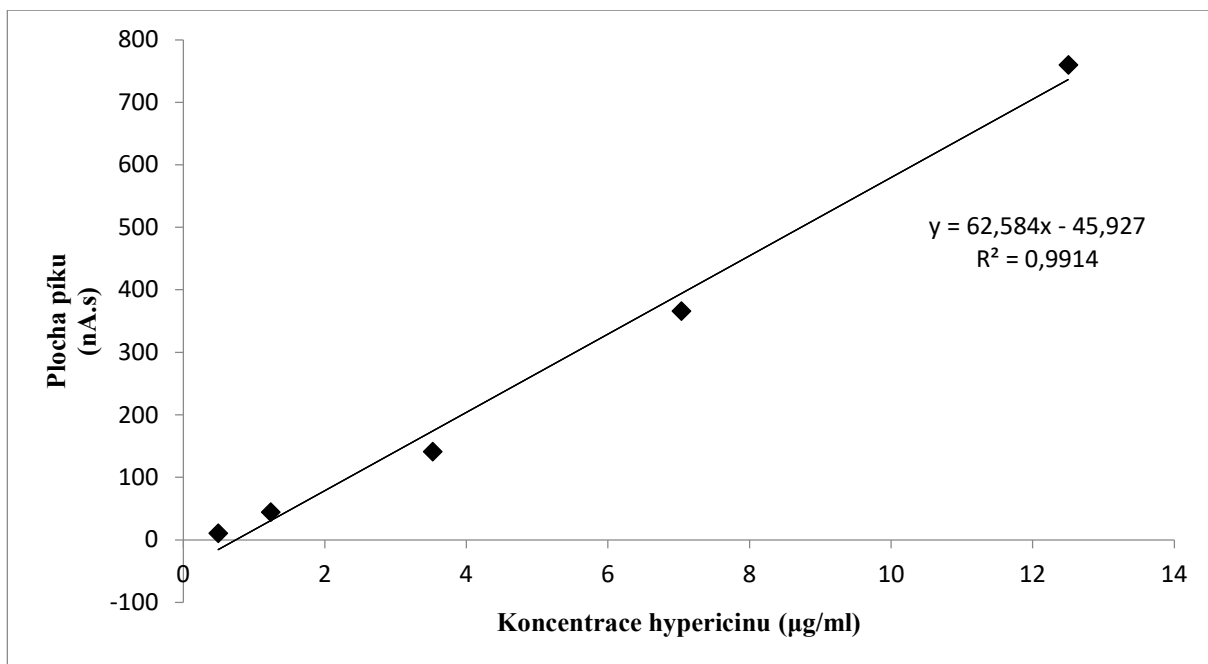
Pro kvantifikaci hypericinu byla zvolena metoda vnějšího standardu. Byly sestrojeny dvě kalibrační závislosti (**Obr. 18** a **Obr. 19**) pro hypericin. Pro každý kalibrační bod byly provedeny tři opakované analýzy.

Pro ECD byla sestrojena další kalibrační křivka, pokrývající oblast koncentrací blízkých LOD.

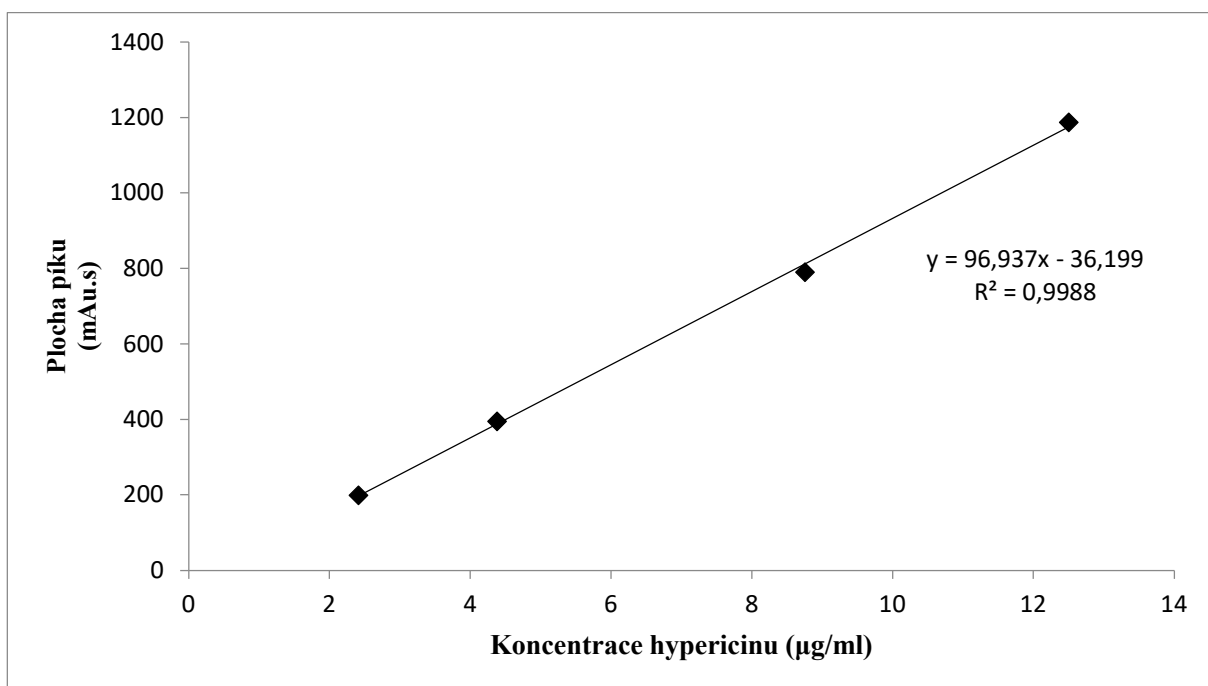
Ze tří slepých pokusů byly vypočteny meze detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) pro každý detektor zvlášť. V separačních metodách se LOD vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie a LOQ jako desetinásobek šumu základní linie.

$$LOD = \frac{3 * h_n}{m} \qquad LOQ = \frac{10 * h_n}{m}$$

kde h_n je šum na základní linii a m je směrnice kalibrační křivky ($f(c)=h$, závislost výšky píku na koncentraci).



Obr. 18 - Kalibrační přímka hypericinu změřená pomocí ECD (n=3)



Obr. 19 - Kalibrační přímka hypericinu změřená pomocí UV-VIS detektoru (n=3)

	UV-VIS detektor ($\lambda=590$ nm)	ECD (E=800 mV vs. Pd/H ₂)
LOD	1,31 $\mu\text{g/ml}$ ($2,6 \cdot 10^{-6}$ mol/l)	0,023 $\mu\text{g/ml}$ ($4,47 \cdot 10^{-8}$ mol/l)
LOQ	2,08 $\mu\text{g/ml}$ ($4,12 \cdot 10^{-6}$ mol/l)	0,069 $\mu\text{g/ml}$ ($1,38 \cdot 10^{-7}$ mol/l)

Tab. II - meze detekce a kvantifikace hypericinu pro spektrofotometrický a amperometrický detektor

Z **Tab. II** je patrné, že ECD má nižší LOD i LOQ oproti UV-VIS detektoru. V rámci LOD je rozdíl zhruba 10^{-2} mol/l, což znamená, že ECD má zhruba o dva řády nižší LOD než UV-VIS detektor. Je potřeba zmínit, že UV-VIS detektor pracoval ve viditelné oblasti, kdy je energie záření nižší než v UV oblasti, ale je dosažena lepší selektivita. Naproti tomu u ECD by bylo možné snížit LOD a LOQ účinnějším potlačením šumu a interferencí okolí (např. sestavením Faradayovy klece). Při nízkých koncentracích (blízke LOQ) bylo pozorováno, že dochází tzv. „paměťovému efektu“. Lze očekávat, že tento efekt by mohl být potlačen při účinnější regeneraci elektrody.

4.5 Kvantifikace hypericinu

V **Tab. III** jsou shrnuty výsledky kvantifikace hypericinu ve vzorcích tinktur. Největší množství hypericinu obsahovala tinktura od firmy Mgr. Jarmila Podhorná Naděje. Tinktura připravená autorem měla druhou nejvyšší koncentraci hypericinu. Právě vlastní tinktura a tinktura od firmy Podhorná mají společný rostlinný materiál, a to květy třezalky tečkované. Vzhledem ke skutečnosti, že tyto tinktury obsahovaly nejvyšší množství hypericinu, lze konstatovat, že nejlepším rostlinným materiálem pro přípravu tinktury bohaté na obsah hypericinu jsou právě květy. Nejmenší množství bylo naměřeno v tinktuře od firmy Serafin. U této tinktury může hrát roli rostlinný materiál ze kterého byla tinktura vyráběna.

vzorek	nalezená množství hypericinu ($\mu\text{g/ml}$)	
	ECD detektor	UV-VIS detektor
Podhorná	9,93	9,86
vlastní tinktura	7,68	7,75
Grešík	4,88	4,74
Serafin	2,41	<LOQ

Tab. III - výsledné koncentrace hypericinu ve vzorcích tinktur (n=3)

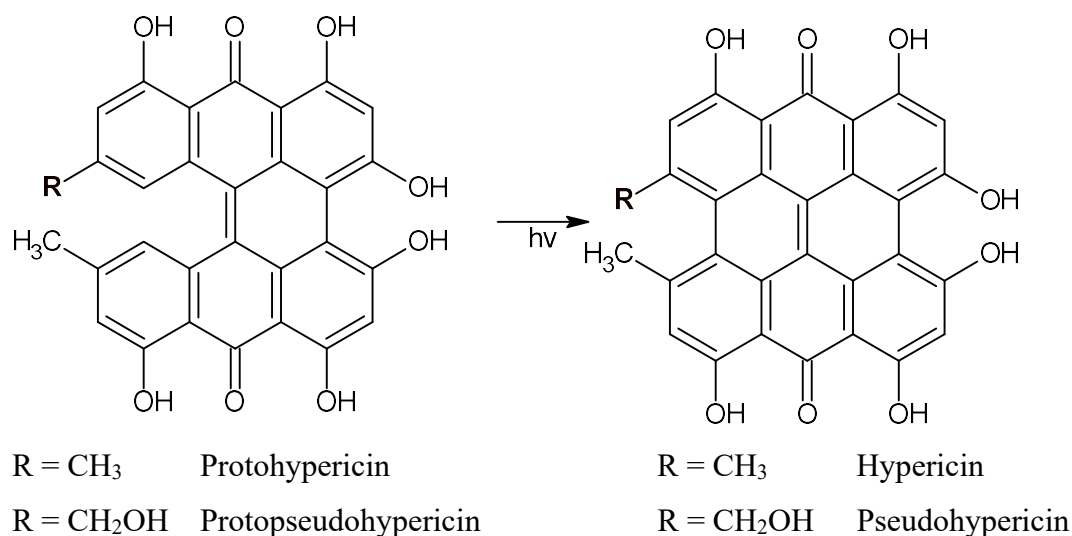
Často se při kvantifikaci látek v přípravcích z třezalky používá termín „celkové hypericiny“, ve kterém je zahrnuto množství hypericinu a pseudohypericinu. Tento pojem se užívá, jelikož se obě látky podílí na terapeutickém efektu stejnou mírou. Podle literatury bývá pseudohypericinu zpravidla třikrát až čtyřikrát více než hypericinu [42]. Uvedený chromatogram tuto skutečnost potvrzuje (**Obr. 21**, str. 56). Obsah hypericinu je ovlivněn stářím tinktury a skladováním. Z tohoto důvodu je nutné při výrobě vlastní tinktury chránit tinkturu před slunečním zářením (např. použitím tmavého skla). Samotní výrobci informují, že tinktury je nutno chránit před přímým slunečním zářením a skladovat je při teplotě do 28 °C.

4.6 Studium kinetiky fotodegradace

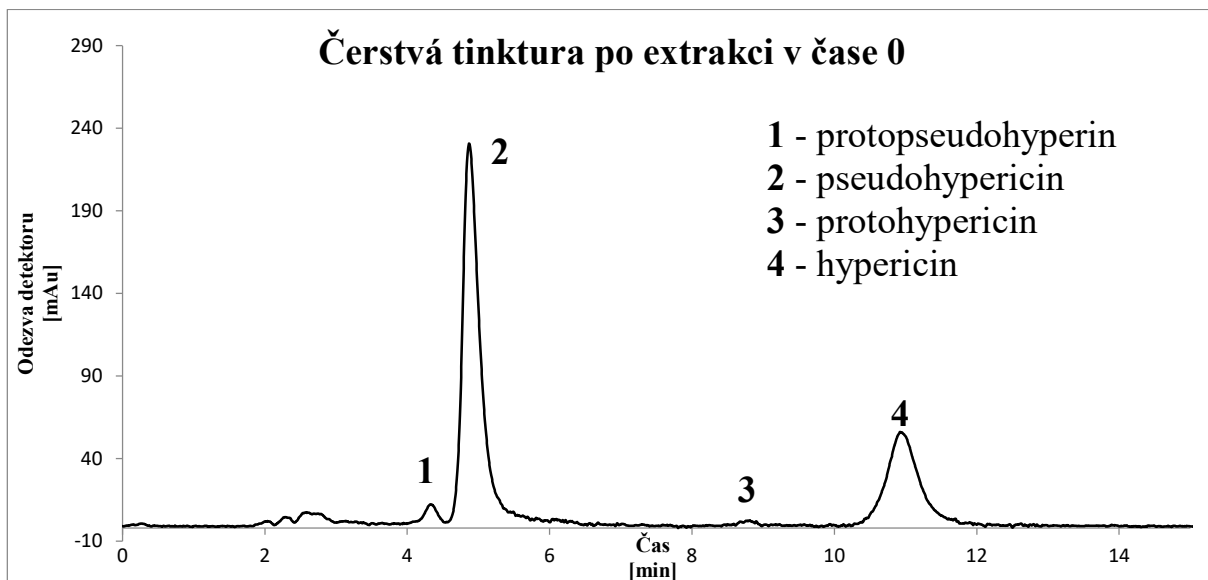
Je známo, že biosyntéza mnoha tříd sekundárních metabolitů je přímo ovlivněna biotickými a abiotickými faktory (světlo, hnojení, stres a fenologie). Mimo to ovlivňuje množství látek také faktory prostředí (intenzita světla, koncentrace CO₂) [112]. Optimální vlnová délka pro transformaci protopigmentů v extraktu je kolem 515 nm (zelená), tato vlnová délka je blízko optimální absorpční úrovni protopigmentů.

Je důležité zmínit, že na rozdíl od hypericinu obsaženého v rostlinných částech může být jeho fototransformace v extraktu úplná a mnohem rychlejší. Důvodem může být mnohem menší koncentrace hypericinu v extraktu, než jaká je v černých tečkách květů. Při zvyšující se koncentraci účinných látek je fotokonverze pomalejší [113].

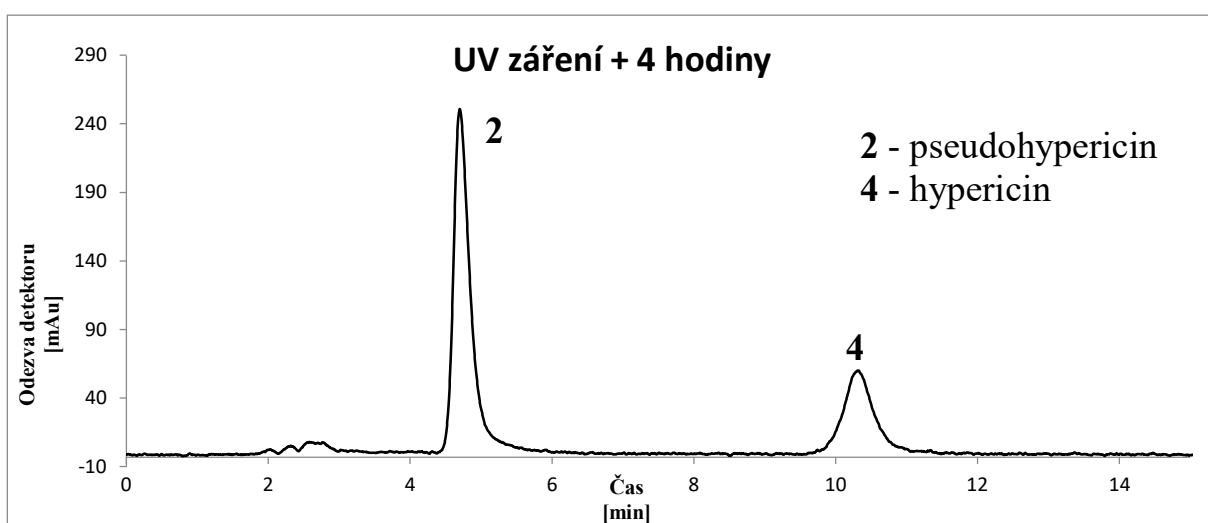
Kinetika byla studována s využitím dvou detektorů (UV-VIS a ECD). **Obr. 21-23** zobrazují chromatogramy téhož extraktu třezalky naměřeného pomocí UV-VIS detektoru. Liší se od sebe časem odběru a zářením, které na ně působilo. Na **Obr. 21** jsou zobrazeny 4 píky (protopseudohypericin, pseudohypericin, protohypericin, hypericin). Zde je nutno říct, že pouze pík hypericinu byl určen pomocí standardu. Ostatní uvedené látky byly určeny na základě shody s literaturou, neboť absorbují při velmi specifické vlnové délce ($\lambda=590$ nm). Absence standardů těchto látek byla zapříčiněna buď vysokou pořizovací cenou nebo komerční nedostupností (protopseudohypericin a protohypericin).



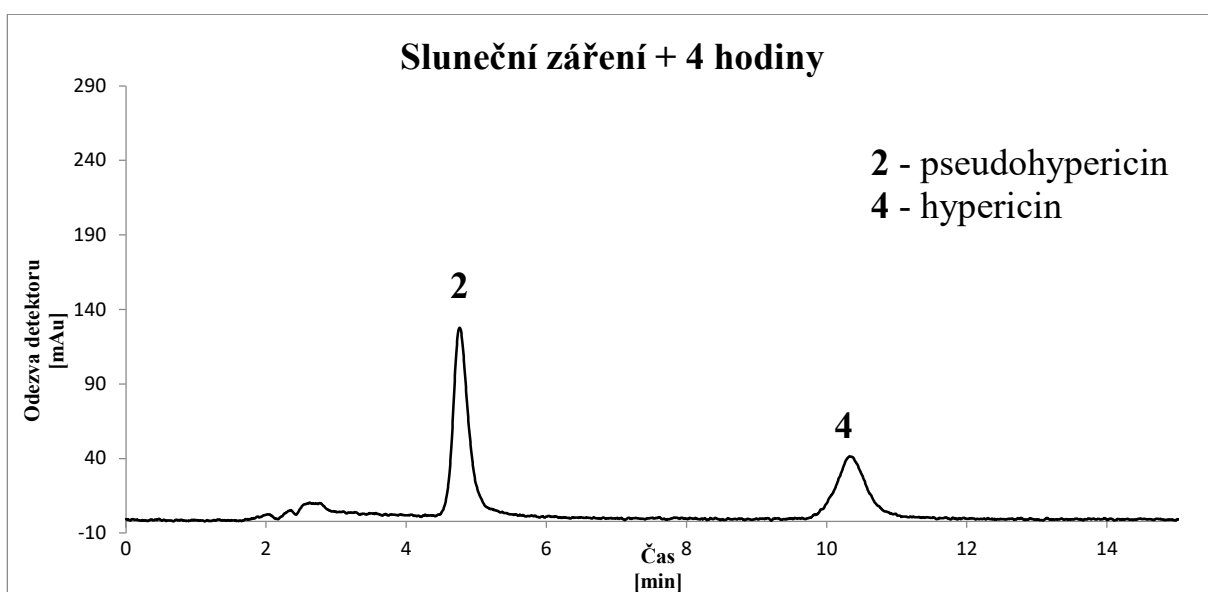
Obr. 20 - Schéma přeměny protoforem vlivem záření na pseudohypericin a hypericin



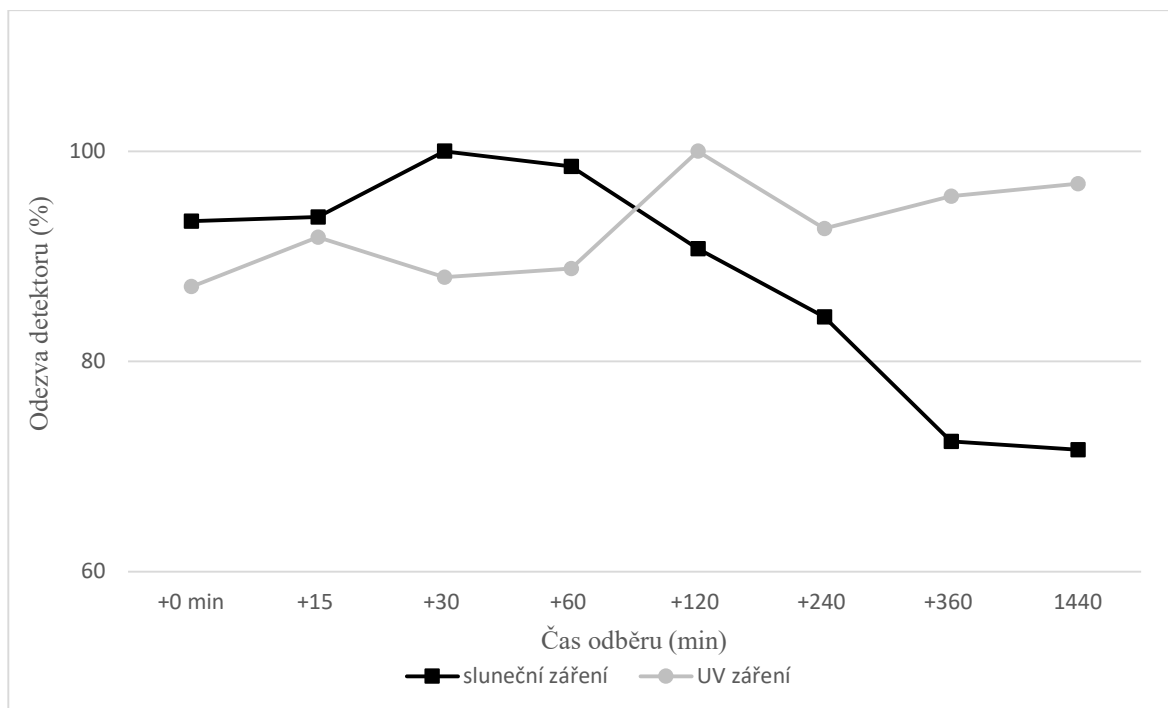
Obr. 21 - Chromatogram extraktu zanalyzovaného těsně po extrakci, tj. v čase +0 min.



Obr. 22 - Chromatogram extraktu po čtyřhodinovém působení UV záření

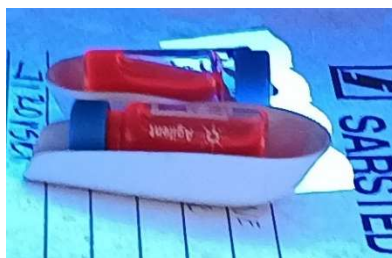


Obr. 23 - Chromatogram extraktu po čtyřhodinovém působení slunečního záření



Obr. 24 - Odezva UV-VIS detektoru (plocha píku) hypericinu vneseného proti době expozice záření

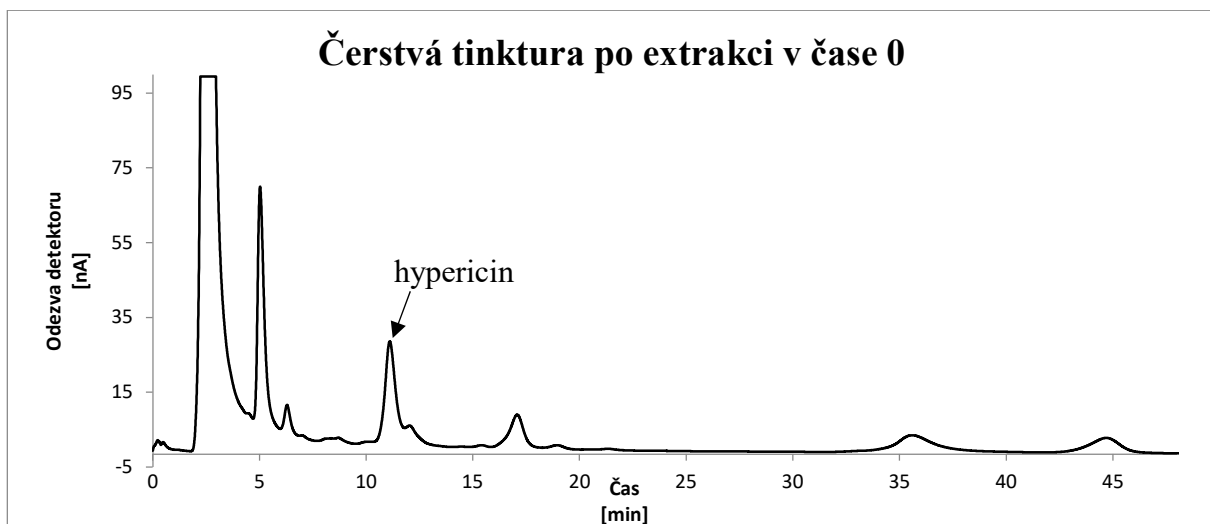
Z **Obr. 21-23** je patrné, že při působení slunečního nebo UV záření dochází k určitým změnám v extraktu třezalky. Jak u extraktu vystaveného slunečnímu záření, tak i UV záření dochází k vymizení protoform pseudohypericinu a hypericinu a k jejich postupné přeměně vlivem záření. Na **Obr. 24** je zobrazen graf znázorňující vliv doby expozice záření na plochu píku. Pro obě křivky byla použita normalizace, tedy vztažení ploch k největší ploše píku (100 %). Z grafu lze vidět, že při působení slunečního záření dochází k poměrně rychlé přeměně protohypericinu na hypericin, ovšem po delším časovém období dochází pravděpodobně k jeho rozkladu vlivem slunečního záření. U UV záření je vidět pomalejší přeměna protoformy na hypericin, oproti slunečnímu záření je větší nárůst píku hypericinu, a po delším působení UV záření nedochází k tak výraznému rozkladu. Rozdíl v průběhu kinetiky může zapříčinit rozdíl v působení záření. U UV záření působila jedna vlnová délka ($\lambda=365$ nm), s větší intenzitou než při působení slunečního záření. Sluneční záření naproti tomu obsahuje záření o vlnových délkách absorpčního maxima protoform a hypericinu. Působením UV záření docházelo k pozorovatelnému fluoreskovaní třezalkového extraktu (**Obr. 25**).



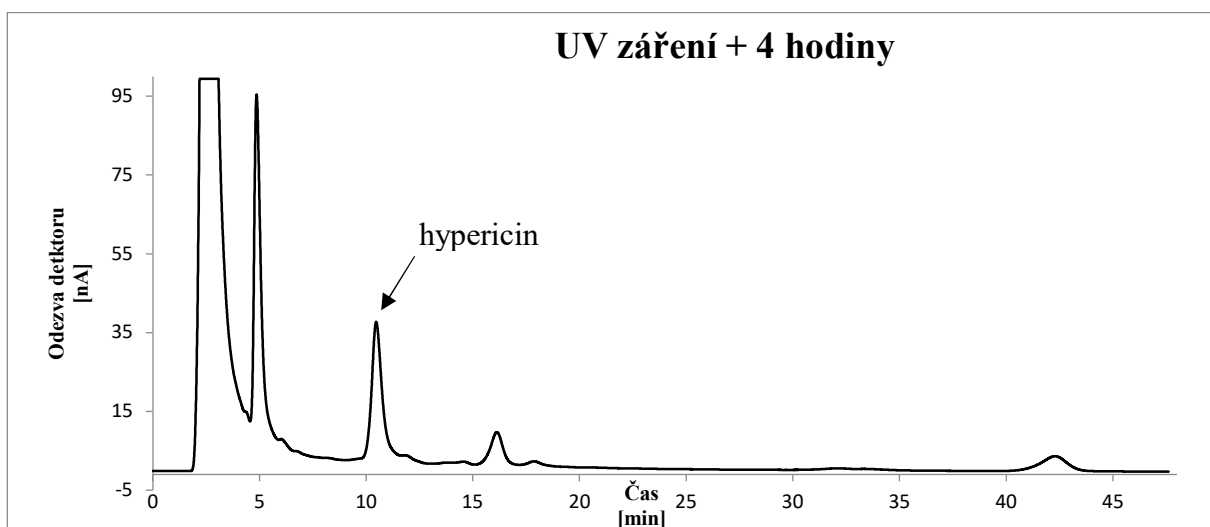
Obr. 25 - Fluorescence hypericinu při působení UV záření ($\lambda=365$ nm)

Obr. 26-28 zobrazují chromatogramy téhož extraktu s využitím ECD. Odlišují se od sebe časem odběru a zářením, které na ně působilo. S jistotou můžeme určit pouze pík hypericinu. Ostatní látky (pseudohypericin, protohypericin a protopseudohypericin) při použití amperometrického detektoru určit nemůžeme, jelikož nemáme stejné možnosti selektivity jako při použití UV-VIS detektoru.

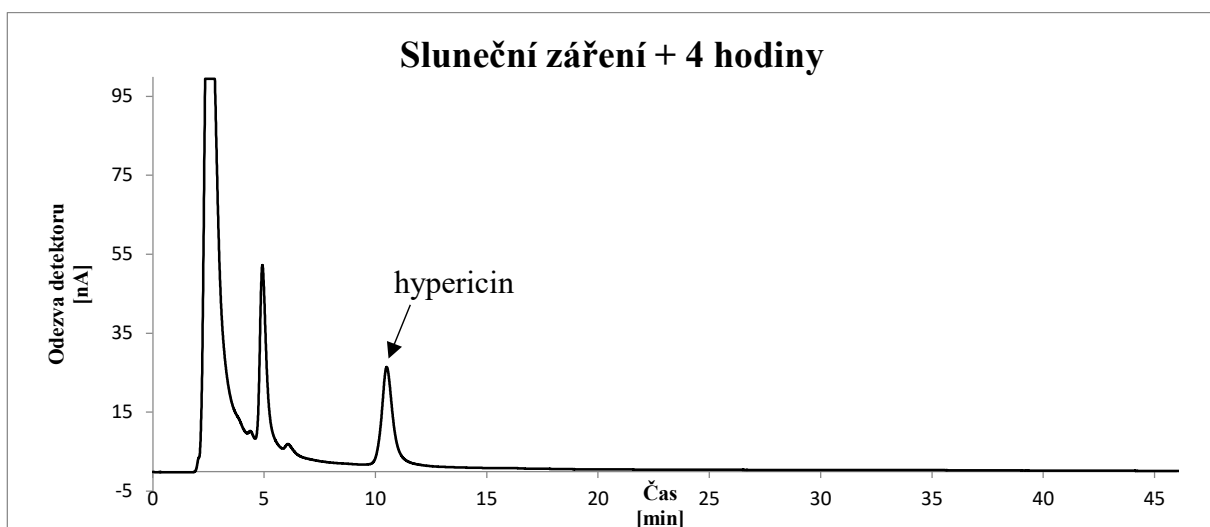
I když ECD není v tomto případě tak selektivní jako UV-VIS detektor ve viditelné části spektra, nabízí nám jiný pohled na kinetiku fotodegradace látek v extraktu z třezalky tečkované. Kromě hypericinu se objevily signály i dalších elektrochemicky aktivních látek. Mělo by se jednat většinou o látky, které jsou uvedené v kapitole **2.2.3 Obsahové látky**. Z důvodu absence standardů nelze určit, o jaké látky se jedná. Na chromatogramech (**Obr. 26-28**) lze vidět, že nejen pík hypericinu podléhá fotodegradaci. Po čtyřech hodinách působení slunečního i UV záření dochází k poklesu signálu u několika dalších látek. Degradace je nejvíce patrná při působení slunečního záření, protože nejspíše obsahovalo záření o vlnových délkách absorpčního maxima daných látek.



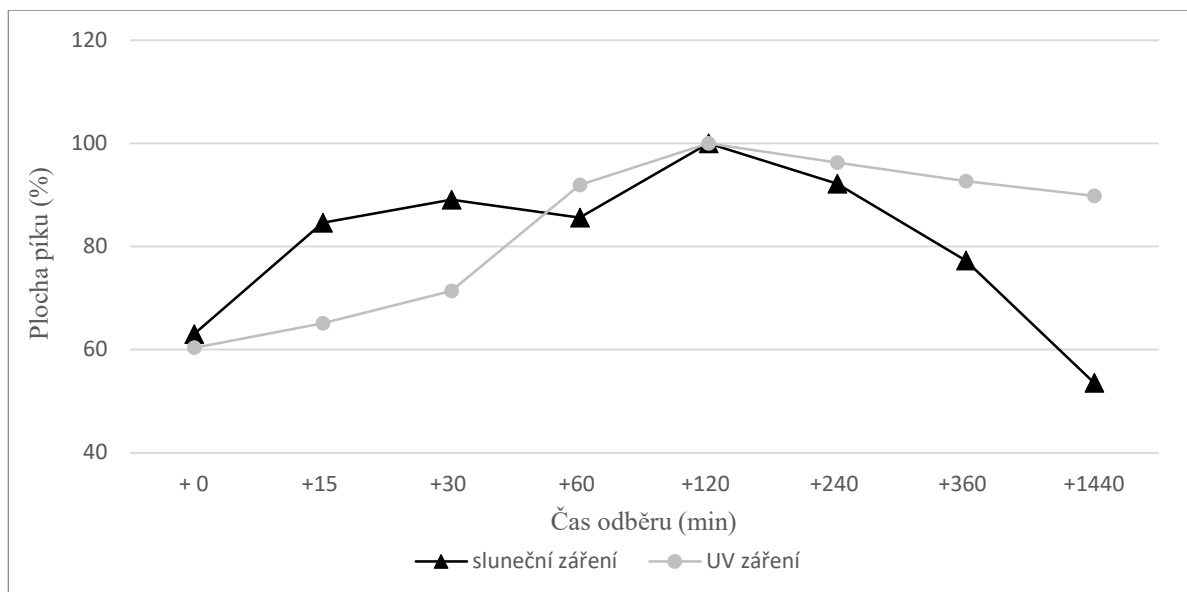
Obr. 26 - Chromatogram extraktu zanalyzovaného těsně po extrakci, tj. v čase +0 min.



Obr. 27 - Chromatogram extraktu po čtyřhodinovém působení UV záření



Obr. 28 - Chromatogram extraktu po čtyřhodinovém působení slunečního záření



Obr. 29 - Odezva ECD (plocha píku) hypericinu vneseného proti době expozice záření

Na **Obr. 29** je vidět nárůst plochy píku hypericinu jak při působení slunečního záření, tak i při působení UV záření. Pro obě křivky byla použita normalizace, tedy vztažení ploch k největší ploše píku (100 %). Plochy píků u obou záření postupně narůstají až do času odběru + 120 min. Poté pravděpodobně dochází (stejně jako u **Obr. 24**) k pravděpodobnému rozkladu. Pokles plochy píku je intenzivnější při působení slunečního záření.

Výše uvedené experimenty naznačují, že čerstvé extrakty třezalky obsahují kromě pseudohypericinu a hypericinu i jejich protoformy, které se následně za poměrně krátkou dobu fototransformují. Byla potvrzena fotosenzibilita hypericinu, kdy po určité době expozice záření docházelo k jeho rozkladu. Tento fenomén je dobře popsán v literatuře [114]. Při působení záření jsou světelná kvanta absorbována hypericinem, čímž dochází ke vzniku excitovaného singletového stavu. Při singletovém excitovaném stavu může nastat mezisystémový přechod do tripletového stavu. Hypericin v tripletovém stavu může excitovat singletový kyslík, který se následně přetvoří v peroxid. Právě tento mechanismus se využívá ve fotodynamické terapii, kdy vzniklý peroxid může způsobovat apoptózu rakovinných buněk.

5 Závěr

Cílem této práce bylo podat širší informace o všeobecně známé a široce využívané rostlině třezalce tečkované (*Hypericum perforatum*) a navrhnout vhodný postup ke stanovení jedné z hlavních účinných látek – hypericinu – v alkoholických tinkturách z třezalky za pomoci HPLC ve spojení s ECD a UV-VIS detektorem. Byla provedena postupná optimalizace podmínek separace (složení mobilní fáze, pH pufru, teplota kolony, stacionární fáze), a poté bylo zkoumáno elektrochemické chování hypericinu pomocí voltametrie (hydrodynamické, cyklické a square-wave). Bylo potvrzeno, že hypericin je možno snadno elektrochemicky oxidovat.

Navržená chromatografická metoda byla použita pro kvantifikaci hypericinu ve vzorcích tinktur. Při srovnávání chromatogramů vzorků tinktur se jednotlivé tinktury od sebe výrazně nelišily spektrem obsažených látek, ale lišily se jejich poměrným zastoupením, což souvisí s použitým výchozím rostlinným materiálem (nať, pupen, květ) při výrobě. Nejnížší obsah hypericinu byl nalezen v tinktuře Serafin, zatímco nejvyšší množství hypericinu bylo zjištěno v tinktuře Podhorná.

Kromě komerčních tinktur byla analyzována i vlastní tinktura, která byla vyrobena pomocí tradiční metody macerace z čerstvě natrhaných květů třezalky tečkované. K extrakci byl použit 50 % ethanol. Při výsledné kvantifikaci měla tato tinktura druhý nejvyšší obsah hypericinu. Domácí výroba vlastní tinktury je jednoduchý proces. K výrobě postačí kvalitní minimálně 40 % alkohol a nejlépe čerstvě sklizené květy třezalky tečkované. Pokud by nebyla k dispozici čerstvě sklizená třezalka, je možno ji nahradit sušenou bylinou.

Byl proveden experiment, který se zabýval studiem kinetiky fotodegradace hypericinu a fototransformací prekurzorů hypericinu vlivem záření. Při tomto experimentu byly čerstvě připravené extrakty z třezalky vystaveny slunečnímu a UV záření. Bylo potvrzeno, že se hypericin vlivem světelného záření rozkládá, což dokládá jeho fotosenzibilitu. Právě tato fotosenzibilita a následný rozklad za vzniku reaktivní formy kyslíku je klíčový jev pro využití hypericinu při fotodynamické terapii.

6 Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
Ag/AgCl	argentchloridová elektroda
BDD	borem dopovaný diamant
CV	cyklický voltamogram
DAD	detektor diodového pole
ECD	elektrochemická detekce
GC	plynová chromatografie
FID	plamenově-ionizační detektor
HDV	hydrodynamický voltamogram
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
MEOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
Pd/H ₂	α -hydrogenpalladiová elektroda
UV	ultrafialová oblast spektra

7 Zdroje

- [1] R. Zhang, Y. Ji, X. Zhang, E. J. Kennelly, C. Long, Ethnopharmacology of *Hypericum* species in China: A comprehensive review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology, *J. Ethnopharmacol.* 254 (2020) 112686.
- [2] N. M. Nürk, S. L. Crockett, Morphological and Phytochemical Diversity among *Hypericum* Species of the Mediterranean Basin., *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 5 (2011) 14–28.
- [3] C. Cirak, J. Radusiene, V. Jakstas, L. Ivanauskas, F. Seyis, F. Yayla, Secondary metabolites of seven *Hypericum* species growing in Turkey, *Pharm. Biol.* 54 (2016) 2244–2253.
- [4] S. Kasper, F. Caraci, B. Forti, F. Drago, E. Aguglia, Efficacy and tolerability of *Hypericum* extract for the treatment of mild to moderate depression, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 20 (2010) 747–765.
- [5] A. Rita, O. Taofiq, I. C. F. R. Ferreira, L. Barros, *Hypericum* genus cosmeceutical application – A decade comprehensive review on its multifunctional biological properties, *Ind. Crop. Prod.* 159 (2021) 113053.
- [6] S. M. Nabavi et al., The water extract of tutsan (*Hypericum androsaemum* L.) red berries exerts antidepressive-like effects and in vivo antioxidant activity in a mouse model of post-stroke depression, *Biomed. Pharmacother.* 99 (2018) 290–298.
- [7] F. Antognoni et al., Polar extracts from the berry-like fruits of *Hypericum androsaemum* L. as a promising ingredient in skin care formulations, *J. Ethnopharmacol.* 195 (2017) 255–265.
- [8] S. L. Crockett, N. K. B. Robson, Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus *Hypericum*., *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 5 (2011) 1–13.
- [9] Z. Jendželovská, R. Jendželovský, B. Kuchárová, P. Fedoročko, Hypericin in the light and in the dark: Two sides of the same coin, *Front. Plant Sci.* 7 (2016) 1–20.
- [10] A. D. Elliston, G. Hatfield, Medicinal plants in folk tradition: an ethnobotany of Britian and Ireland, , 292004.

- [11] C. Zorzetto et al., Phytochemical analysis and in vitro biological activity of three *Hypericum* species from the Canary Islands (*Hypericum reflexum*, *Hypericum canariense* and *Hypericum grandifolium*), *Fitoterapia* 100 (2015) 95–109.
- [12] R. M. Rabanal, A. Arias, B. Prado, M. Hernández-Pérez, C. C. Sánchez-Mateo, Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands, *J. Ethnopharmacol.* 81 (2002) 287–292.
- [13] C. C. Sánchez-Mateo, C. X. Bonkanka, R. M. Rabanal, *Hypericum grandifolium* Choisy: A species native to Macaronesian Region with antidepressant effect, *J. Ethnopharmacol.* 121 (2009) 297–303.
- [14] F. Wu et al., Protective effects of aqueous extract from *Acanthopanax senticosus* against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12 cells, *J. Ethnopharmacol.* 148 (2013) 861–868.
- [15] Y. R. Zeng et al., Chromanopyrones and a flavone from *Hypericum monogynum*, *Fitoterapia* 125 (2018) 59–64.
- [16] Y.-Y. Li et al., Isopropylpyrone and Phenylpyrones from the Leaves of *Hypericum monogynum*, *ChemistrySelect* 5 (2020) 2317–2321.
- [17] A. Bertoli, C. Çirak, F. Seyis, *Hypericum organifolium* Willd.: The essential oil composition of a new valuable species, *Ind. Crops Prod.* 77 (2015) 676–679.
- [18] C. Çirak, J. Radušienė, L. Ivanauskas, V. Janulis, Variation of bioactive secondary metabolites in *Hypericum organifolium* during its phenological cycle, *Acta Physiol. Plant.* 29 (2007) 197–203.
- [19] R. Boran, Investigations of anti-aging potential of *Hypericum organifolium* Willd. for skincare formulations, *Ind. Crops Prod.* 118 (2018) 290–295.
- [20] Ş. N. Yaşar et al., Central nervous system activities of *hypericum organifolium* extract via GABAergic and opioidergic mechanisms, *Phyther. Res.* 27 (2013) 877–884.
- [21] J. Zhang et al., Novel degraded polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol and new polyprenylated benzophenone from *Hypericum sampsonii*, *Phytochem. Lett.* 21 (2017) 190–193.

- [22] J. Chen, H. Chen, Y. Lin, Novel Polyprenylated Phloroglucinols from *Hypericum sampsonii*, *Molecules* (2014) 19836–19844.
- [23] X.-N. Liu, X.-Q. Zhang, J.-S. Sun, Effects of cytokinins and elicitors on the production of hypericins and hyperforin metabolites in *Hypericum sampsonii* and *Hypericum perforatum*, *Plant Growth Regul* (2007) 207–214.
- [24] Q. Chen, L. Di, Y. Zhang, N. Li, Chemical constituents with cytotoxic and anti-inflammatory activity in *Hypericum sampsonii* and the antitumor potential under the view of cancer-related inflammation, *J. Ethnopharmacol.* 259 (2020) 112948.
- [25] C. Huang, T. Chang, Y. Wu, Y. Chen, J. Chen, Derivatives from *Hypericum sampsonii* with, *Molecules* (2020) .
- [26] H. Zhu et al., Hyperisampsins H-M, Cytotoxic Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols from *Hypericum sampsonii*, *Sci. Rep.* 5 (2015) 1–11.
- [27] <https://garden.org/plants/photo/532575/>, staženo 01. března 2022.
- [28] C. R. Hobbs, St. John's Wort-Ancient Herbal Protector, *Pharm. Hist.* 32 (1990) 166–169.
- [29] A. Kotsiou, N. Seferos, H. G. Mikail, C. Tesseromatis, Pleiotropic activity of *Hypericum perforatum* L, *J. Med. Plants Stud.* 4 (2016) 256–258.
- [30] R. K. Gupta, H. J. Möller, St. John's Wort: An option for the primary care treatment of depressive patients?, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 253 (2003) 140–148.
- [31] I. P. Süntar et al., Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L., *J. Ethnopharmacol.* 127 (2010) 468–477.
- [32] M. Idolo, R. Motti, S. Mazzoleni, Ethnobotanical and phytomedicinal knowledge in a long-history protected area, the Abruzzo, Lazio and Molise National Park (Italian Apennines), *J. Ethnopharmacol.* 127 (2010) 379–395.
- [33] R. Y. Cavero, S. Akerreta, M. I. Calvo, Pharmaceutical ethnobotany in Northern Navarra (Iberian Peninsula), *J. Ethnopharmacol.* 133 (2011) 138–146.
- [34] S. Jarić et al., Traditional wound-healing plants used in the Balkan region (Southeast Europe), *J. Ethnopharmacol.* 211 (2018) 311–328.

- [35] S. Jarić et al., An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia), *J. Ethnopharmacol.* 175 (2015) 93–108.
- [36] B. Šarić-Kundalić, C. Dobeš, V. Klatte-Asselmeyer, J. Saukel, Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina, *J. Ethnopharmacol.* 133 (2011) 1051–1076.
- [37] B. K. Zlatković, S. S. Bogosavljević, A. R. Radivojević, M. A. Pavlović, Traditional use of the native medicinal plant resource of Mt. Rtanj (Eastern Serbia): Ethnobotanical evaluation and comparison, *J. Ethnopharmacol.* 151 (2014) 704–713.
- [38] R. Kalle, R. Sõukand, The name to remember: Flexibility and contextuality of preliterate folk plant categorization from the 1830s, in Pernau, Livonia, historical region on the eastern coast of the Baltic Sea, *J. Ethnopharmacol.* 264 (2021) .
- [39] R. Sõukand, R. Kalle, Where does the border lie: Locally grown plants used for making tea for recreation and/or healing, 1970s-1990s Estonia, *J. Ethnopharmacol.* 150 (2013) 162–174.
- [40] A. I. Oliveira, C. Pinho, B. Sarmento, A. C. P. Dias, Neuroprotective activity of hypericum perforatum and its major components, *Front. Plant Sci.* 7 (2016) .
- [41] H. Bridi, G. de C. Meirelles, G. L. von Poser, Structural diversity and biological activities of phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species, *Phytochemistry* 155 (2018) 203–232.
- [42] A. Karioti, A. R. Bilia, Hypericins as potential leads for new therapeutics, *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010) 562–594.
- [43] L. F. Huang, Z. H. Wang, S. L. Chen, Hypericin: Chemical synthesis and biosynthesis, *Chin. J. Nat. Med.* 12 (2014) 81–88.
- [44] K. Michalska, H. Fernandes, M. Sikorski, M. Jaskolski, Crystal structure of Hyp-1, a St. John's wort protein implicated in the biosynthesis of hypericin, *J. Struct. Biol.* 169 (2010) 161–171.
- [45] P. Rizzo, L. Altschmied, B. M. Ravindran, T. Rutten, J. C. D'auria, The biochemical and genetic basis for the biosynthesis of bioactive compounds in *hypericum perforatum* L., one of the largest medicinal crops in Europe, *Genes (Basel)*. 11 (2020) 1–21.

- [46] C. P. Ting, T. J. Maimone, Total Synthesis of Hyperforin, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 10516–10519.
- [47] M. Gaid et al., Biotechnological production of hyperforin for pharmaceutical formulation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 126 (2018) 10–26.
- [48] X. W. Yang, R. B. Grossman, G. Xu, Research Progress of Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols, *Chem. Rev.* 118 (2018) 3508–3558.
- [49] A. N. Panche, A. D. Diwan, S. R. Chandra, Flavonoids: An overview, *J. Nutr. Sci.* 5 (2016) .
- [50] N. Kalogeropoulos, K. Yannakopoulou, A. Gioxari, A. Chiou, D. P. Makris, Polyphenol characterization and encapsulation in β -cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract, *LWT - Food Sci. Technol.* 43 (2010) 882–889.
- [51] N. Tocci et al., Exodermis and endodermis are the sites of xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* roots, *New Phytol.* 217 (2018) 1099–1112.
- [52] O. Tusevski, J. Petreska Stanoeva, M. Stefova, S. Gadzovska Simic, *Agrobacterium* enhances xanthone production in *Hypericum perforatum* cell suspensions, *Plant Growth Regul.* 76 (2015) 199–210.
- [53] J. Barnes, J. T. Arnason, B. D. Roufogalis, St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): botanical, chemical, pharmacological and clinical advances, *J. Pharm. Pharmacol.* 71 (2019) 1–3.
- [54] A. R. Bilia, M. do C. Costa, Medicinal plants and their preparations in the European market: Why has the harmonization failed? The cases of St. John's wort, valerian, ginkgo, ginseng, and green tea, *Phytomedicine* 81 (2021) .
- [55] A. R. Bilia, Herbal medicinal products versus botanical-food supplements in the european market: State of art and perspectives, *Nat. Prod. Commun.* 10 (2015) 125–131.
- [56] R. Crupi, Y. Abusamra, E. Spina, G. Calapai, Preclinical Data Supporting/Refuting the Use of *Hypericum perforatum* in the Treatment of Depression, *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* 12 (2013) 474–486.

- [57] F. Di Pierro, P. Risso, R. Settembre, Role in depression of a multi-fractionated versus a conventional *Hypericum perforatum* extract, *Panminerva Med.* 60 (2018) 156–160.
- [58] E. Russo et al., *Hypericum perforatum*: Pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability, and clinical drug-drug interactions, *Phyther. Res.* 28 (2014) 643–655.
- [59] V. S. Velingkar, G. L. Gupta, N. B. Hegde, A current update on phytochemistry, pharmacology and herb–drug interactions of *Hypericum perforatum*, *Phytochem. Rev.* 16 (2017) 725–744.
- [60] Z. Saddiqe, I. Naeem, A. Maimoona, A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L., *J. Ethnopharmacol.* 131 (2010) 511–521.
- [61] U. Wölflle, G. Seelinger, C. M. Schempp, Topical application of St John’s wort (*Hypericum perforatum*), *Planta Med.* 80 (2014) 109–120.
- [62] C. M. N. Yow, H. M. Tang, E. S. M. Chu, Z. Huang, Hypericin-mediated Photodynamic Antimicrobial Effect on Clinically Isolated Pathogens †, (2012) 626–632.
- [63] H. Chen et al., Antiviral activity against infectious bronchitis virus and bioactive components of *Hypericum perforatum* L., *Front. Pharmacol.* 10 (2019) 1–22.
- [64] C. M. Shih, C. H. Wu, W. J. Wu, Y. M. Hsiao, J. L. Ko, Hypericin inhibits hepatitis C virus replication via deacetylation and down-regulation of heme oxygenase-1, *Phytomedicine* 46 (2018) 193–198.
- [65] H. Sato et al., Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion, *Neuroscience* 248 (2013) 345–358.
- [66] P. Rajendran et al., Antioxidants and human diseases, *Clin. Chim. Acta* 436 (2014) 332–347.
- [67] G. Pizzino et al., Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017 (2017) .
- [68] J. Q. Wu, T. R. Kosten, X. Y. Zhang, Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 46 (2013) 200–206.

- [69] G. J. Burton, E. Jauniaux, Oxidative stress, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25 (2011) 287–299.
- [70] A. Agarwal, D. Durairajanayagam, J. Halabi, J. Peng, M. Vazquez-Levin, Proteomics, oxidative stress and male infertility, *Reprod. Biomed. Online* 29 (2014) 32–58.
- [71] F. Uslusoy, M. Nazıroğlu, İ. S. Övey, T. T. Sönmez, Hypericum perforatum L. supplementation protects sciatic nerve injury-induced apoptotic, inflammatory and oxidative damage to muscle, blood and brain in rats, *J. Pharm. Pharmacol.* 71 (2019) 83–92.
- [72] K. Wise, S. Selby-pham, L. Bennett, J. Selby-pham, Pharmacokinetic properties of phytochemicals in Hypericum perforatum influence efficacy of regulating oxidative stress, *Phytomedicine* 59 (2019) .
- [73] Y.-P. Zou, Y.-H. Lu, D.-Z. Wei, Protective Effects of a Flavonoid-rich Extract of Hypericum perforatum L. against Hydrogen Peroxide-induced Apoptosis in PC12 Cells, *Phyther. Res.* 22 (2009) 544–549.
- [74] B. Mansoori et al., Photodynamic therapy for cancer: Role of natural products, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 26 (2019) 395–404.
- [75] A. Oniszczyk, K. A. Wojtunik-Kulesza, T. Oniszczyk, K. Kasprzak, The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use, *Biomed. Pharmacother.* 83 (2016) 912–929.
- [76] A. B. Ormond, H. S. Freeman, Dye sensitizers for photodynamic therapy, *Materials (Basel)*. 6 (2013) 817–840.
- [77] H. Abrahamse, M. R. Hamblin, New photosensitizers for photodynamic therapy, *Biochem. J.* 473 (2016) 347–364.
- [78] L. Lenkavska et al., Benefits of hypericin transport and delivery by low- and high-density lipoproteins to cancer cells: From in vitro to ex ovo, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 25 (2019) 214–224.
- [79] C. Han et al., Hypericin-functionalized graphene oxide for enhanced mitochondria-targeting and synergistic anticancer effect, *Acta Biomater.* 77 (2018) 268–281.

- [80] T. A. Tabish, R. J. Narayan, Mitochondria-targeted graphene for advanced cancer therapeutics, *Acta Biomater.* 129 (2021) 43–56.
- [81] F. N. Biteghe, L. M. Davids, A combination of photodynamic therapy and chemotherapy displays a differential cytotoxic effect on human metastatic melanoma cells, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 166 (2017) 18–27.
- [82] L. M. Davids, B. Kleemann, Combating melanoma: The use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool, *Cancer Treat. Rev.* 37 (2011) 465–475.
- [83] B. Kleemann, B. Loos, T. J. Scriba, D. Lang, L. M. Davids, St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) photomedicine: Hypericin-photodynamic therapy induces metastatic melanoma cell death, *PLoS One* 9 (2014) .
- [84] G. Menichini et al., *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum* induces inhibition of free radicals and enhanced phototoxicity in human melanoma cells under ultraviolet light, *Cell Prolif.* 46 (2013) 193–202.
- [85] M. Marrelli, G. Statti, F. Conforti, *Hypericum* spp.: An Update on the Biological Activities and Metabolic Profiles , *Mini-Reviews Med. Chem.* 20 (2019) 66–87.
- [86] S. Nicolussi, J. Drewe, V. Butterweck, H. E. Meyer zu Schwabedissen, Clinical relevance of St. John's wort drug interactions revisited, *Br. J. Pharmacol.* 177 (2020) 1212–1226.
- [87] V. Schulz, Clinical trials with hypericum extracts in patients with depression--results, comparisons, conclusions for therapy with antidepressant drugs., *Phytotherapy* 9 (2002) 468–474.
- [88] M. Strzemeski et al., Direct spectroscopic and GC profiling combined with chemometric analysis as an alternative approach to investigate *Hypericum* species: Is it possible to replace HPLC?, *Ind. Crops Prod.* 157 (2020) .
- [89] V. A. Huck-Pezzei et al., Fourier transform infrared imaging analysis in discrimination studies of St. John's wort (*Hypericum perforatum*), *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 1771–1778.
- [90] V. A. Huck-Pezzei et al., A chromatographic and spectroscopic analytical platform for the characterization of St John's wort extract adulterations, *Anal. Methods* 5 (2013) 616–628.

- [91] J. D. Owen, S. J. Evans, A. Guirguis, K. Kellett, J. L. Stair, Method development for the determination of elements in *Hypericum perforatum* L. (St John's wort) herb and preparations using inductively coupled plasma–optical emission spectroscopy and microwave digestion, *J. Pharm. Pharmacol.* 71 (2019) 38–45.
- [92] M. R. Gomez, S. Cerutti, R. A. Olsina, M. F. Silva, L. D. Martínez, Metal content monitoring in *Hypericum perforatum* pharmaceutical derivatives by atomic absorption and emission spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 569–576.
- [93] A. Booker, A. Agapouda, D. A. Frommenwiler, F. Scotti, E. Reich, M. Heinrich, St John's wort (*Hypericum perforatum*) products – an assessment of their authenticity and quality, *Phytomedicine* 40 (2018) 158–164.
- [94] K. Zeliou, N. I. Kontaxis, E. Margianni, C. Petrou, F. N. Lamari, Optimized and Validated HPLC Analysis of St. John's Wort Extract and Final Products by Simultaneous Determination of Major Ingredients, *J. Chromatogr. Sci.* 55 (2017) 805–812.
- [95] M. Pietrzak, M. Szabelski, A. Kasparek, Z. Wieczorek, Interactions of hypericin with a model mutagen – Acridine orange analyzed by light absorption and fluorescence spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.* 669 (2017) 85–91.
- [96] A. Agapouda, A. Booker, T. Kiss, J. Hohmann, M. Heinrich, D. Csupor, Quality control of *Hypericum perforatum* L. analytical challenges and recent progress, *J. Pharm. Pharmacol.* 71 (2019) 15–37.
- [97] A. Bertoli, C. Çirak, F. Seyis, *Hypericum* spp. volatile profiling and the potential significance in the quality control of new valuable raw material, *Microchem. J.* 136 (2018) 94–100.
- [98] W. Wang, P. Lin, L. Ma, K. Xu, X. Lin, Separation and determination of flavonoids in three traditional chinese medicines by capillary electrophoresis with amperometric detection, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 1357–1362.
- [99] R. Hamoudová, M. Pospíšilivá, J. Spilková, Analysis of selected constituents in methanolic extracts of *Hypericum perforatum* collected in different localities by capillary ITP-CZE, *Electrophoresis* 27 (2006) 4820–4826.

- [100] S. Dresler, J. Kováčik, M. Strzemeski, I. Sowa, M. Wójciak-Kosior, Methodological aspects of biologically active compounds quantification in the genus *Hypericum*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 155 (2018) 82–90.
- [101] G. Micali, F. Lanuzza, P. Currò, High-performance liquid chromatographic determination of the biologically active principle hypericin in phytotherapeutic vegetable extracts and alcoholic beverages, *J. Chromatogr. A* 731 (1996) 336–339.
- [102] F. Seyis, E. Yurteri, A. Ozcan, C. Cirak, South African Journal of Botany Altitudinal impacts on chemical content and composition of *Hypericum perforatum*, a prominent medicinal herb, 135 (2020) .
- [103] F. Pellati, S. Benvenuti, M. Melegari, Chromatographic performance of a new polar poly(ethylene glycol) bonded phase for the phytochemical analysis of *Hypericum perforatum* L., *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 205–217.
- [104] M. Pradeep, P. Kachlicki, G. Franklin, Simultaneous determination of naphthodianthrones, emodin, skyrin and new bisanthrones in *Hypericum perforatum* L. in vitro shoot cultures, *Ind. Crops Prod.* 144 (2020) 112003.
- [105] J. Zhang, C. Feng, H. Xu, X. Tan, P. L. Hagedoorn, S. Ding, Enhanced hypericin extraction from *Hypericum perforatum* L. by coupling microwave with enzyme-assisted strategy, *Ind. Crops Prod.* 137 (2019) 231–238.
- [106] L. Rusalepp, A. Raal, T. Püssa, U. Mäeorg, Comparison of chemical composition of *Hypericum perforatum* and *H. maculatum* in Estonia, *Biochem. Syst. Ecol.* 73 (2017) 41–46.
- [107] A. Paulke, M. Schubert-Zsilavec, M. Wurglics, Determination of hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* in rat brain after oral administration, *Monatshefte für Chemie* 139 (2008) 489–494.
- [108] U. Rückert, K. Eggenreich, W. Likussar, R. Wintersteiger, A. Michelitsch, A high-performance liquid chromatography with electrochemical detection for the determination of total hypericin in extracts of St. John's wort, *Phytochem. Anal.* 17 (2006) 162–167.

- [109] U. Rückert, W. Likussar, A. Michelitsch, Simultaneous Determination of Total Hypericin and Hyperforin in St. John's Wort Extracts by HPLC with Electrochemical Detection, *J. Chromatogr. A* 1181 (2007) 204–208.
- [110] U. Rückert, K. Eggenreich, R. Wintersteiger, M. Wurglics, W. Likussar, A. Michelitsch, Development of a high-performance liquid chromatographic method with electrochemical detection for the determination of hyperforin, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 181–185.
- [111] A. Michelitsch, M. Wurglics, Electrochemical oxidation of hyperforin on glassy carbon electrode and determination in herbal medicinal products, *Electroanalysis* 15 (2003) 797–802.
- [112] M. Xenophontos, I. Stavropoulos, E. Avramakis, E. Navakoudis, D. Dörnemann, K. Kotzabasis, Influence of the habitat altitude on the (proto)hypericin and (proto)pseudohypericin levels of *Hypericum* plants from Crete, *Planta Med.* 74 (2008) 1496–1503.
- [113] E. Bombardelli, P. Morazzoni, *Hypericum perforatum*, *Fitoterapia* 66 (1995) 43–68.
- [114] J. Zhang et al., Hypericin: Source, Determination, Separation, and Properties, *Sep. Purif. Rev.* 51 (2022) 1–10.