

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra chemie

HPLC analýza aromatických látek odvozených od
antrachinonu v třezalce tečkované (*Hypericum perforatum L.*)

Bakalářská práce

Autor: Iva Svobodová
Studijní program: B1407 Chemie
Studijní obor: S14CH041BP Chemie
Vedoucí práce: Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Zadání bakalářské práce

Autor:	Iva Svobodová
Studijní program:	B1407 Chemie
Studijní obor:	S14CH041BP Chemie
Název práce:	HPLC analýza aromatických látek odvozených od antrachinonu v třezalce tečkované (<i>Hypericum perforatum L.</i>)
Název práce v AJ:	HPLC analysis of aromatic substances derived from anthraquinone of St. John's Wort (<i>Hypericum perforatum L.</i>)

Cíl a metody práce:

Bakalářská práce se zaměřuje na analýzu aromatických látek obsažených v částech třezalky tečkované pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Teoretická část práce se věnuje charakterizaci fyzikálně-chemických a biologických vlastností účinných látek v třezalce tečkované (tj. hypericin a hyperforin), metodice chromatografické separace a stanovení aromátů. Praktická část práce se zaměřuje na vývoj vhodné analytické HPLC metody s využitím klasické reverzní fáze s C18 modifikací a fází s pentafluorfenylovou skupinou.

Garantující pracoviště:	Katedra chemie, Přírodovědecká fakulta UHK
Vedoucí práce:	Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.
Oponent:	PharmDr. Adam Skarka, Ph.D.
Datum zadání práce:	4. 1. 2016
Datum odevzdání práce:	23. 7. 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne
23. 7. 2018

.....
Iva Svobodová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce **Mgr. et Mgr. Rafaelu Doležalovi, Ph.D.** za trpělivost, ochotu a odborné vedení této bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat Centru biomedicínského výzkumu v Hradci Králové za poskytnutí laboratoří a jejich vybavení k naměření experimentálních dat.

Anotace:

SVOBODOVÁ I. *HPLC analýza aromatických látek odvozených od antrachinonu v třezalce tečkované (Hypericum perforatum L.)*. Hradec Králové, 2018. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D. 78 s.

Bakalářská práce se zabývá analýzou polyfenolických látek obsažených v částech třezalky tečkované pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Teoretická část práce se věnuje metodice chromatografické separace, kvantitativnímu stanovení polyfenolů a principům identifikace látek pomocí hmotnostní spektrometrie (MS), dále charakterizaci fyzikálně-chemických a biologických vlastností účinných látek v třezalce tečkované (tj. hypericin a hyperforin). Praktická část práce se zaměřuje na vývoj vhodné analytické HPLC metody s využitím klasické reverzní fáze s C18 modifikací a fáze s pentafluorfenylovou skupinou (PFP). Cílem bakalářské práce je posoudit přínos stacionární fáze s PFP skupinou pro separaci polyfenolických látek, vyvinout vhodnou HPLC metodu a stanovit s její pomocí obsah hypericinu ve vzorcích listu, květu, nati a kořene třezalky tečkované.

Klíčová slova: HPLC, třezalka tečkovaná, hypericin, pentafluorfenylová fáze

Annotation:

SVOBODOVÁ I. *HPLC analysis of aromatic compounds derived from anthraquinone in St. John's wort (Hypericum perforatum L.)*. Hradec Králové, 2018. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D. 78 s.

The bachelor thesis deals with the analysis of the polyphenolic substances contained in the parts of St. John's wort using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The theoretical part of the work is dedicated to the methodology of chromatographic separation, quantitative determination of polyphenols, principles of identification by mass spectrometry (MS), characterization of physico-chemical and biological properties of active substances in the St. John's wort (i.e. hypericin and hyperforin). The practical part of the work focuses on the development of suitable analytical HPLC methods using classical reverse phase with C18 modification and phase with pentafluorophenyl group (PFP). The objective of the bachelor thesis is to evaluate benefits of the stationary phase with PFP function to separation of polyphenols, to develop a suitable HPLC method and to determine the content of hypericin in samples of leaves, blossoms, stems and roots of St. John's Wort.

Keywords: HPLC, St. John's wort, hypericin, pentafluorophenyl phase

Obsah:

Úvod	9
1. Teoretická část.....	10
1.1. Separační metody	10
1.1.1. Chromatografické metody.....	11
1.1.1.1. Historický vývoj chromatografie.....	11
1.1.1.2. Princip chromatografie	11
1.1.1.3. Rozdělení chromatografických metod.....	13
1.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	14
1.2.1. Základní parametry chromatografické separace.....	15
1.2.1.1. Van Deemterova rovnice	15
1.2.1.2. Retenční faktor, retenční čas a retenční objem	16
1.2.1.3. Účinnost chromatografické kolony	17
1.2.1.4. Rozlišení a asymetrie píku.....	17
1.2.2. Instrumentace v HPLC.....	19
1.2.3. Typy eluce.....	20
1.2.4. Typy stacionární fáze.....	22
1.2.4.1. Reverzní fáze na bázi silikagelu s oktadecylovými řetězci	22
1.2.4.2. Reverzní fáze na bázi silikagelu s pentafluorfenylovou skupinou.....	23
1.3. Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie.....	25
1.4. Třezalka tečkovaná (<i>Hypericum perforatum L.</i>).....	26
1.4.1. Historie použití třezalky tečkované.....	26
1.4.2. Botanické vlastnosti třezalky tečkované	27
1.4.1. Farmaceutické využití třezalky tečkované.....	27
1.4.2. Aplikace HPLC ve studiu látek z třezalky tečkované	28
1.4.3. Chemické struktury vybraných látek v třezalce tečkované.....	29
1.4.4. Fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných látek z třezalky tečkované.....	30
2. Cíl práce.....	32
3. Experimentální část.....	33
3.1. Použité přístroje, programy a pomůcky	33

3.2.	Použité chromatografické kolony	34
3.3.	Použité chemikálie	34
3.4.	Příprava vzorků třezalky tečkované.....	34
3.5.	Vývoj analytické metody pro stanovení hypericinu	35
3.5.1.	Přístrojové nastavení	36
3.5.2.	HPLC analýza standardního roztoku hypericinu na chromatografických kolonách typu PFP a C18 v normálním módu.....	37
3.5.3.	HPLC analýza standardního roztoku hypericinu na chromatografických kolonách typu PFP a C18 v polárně organickém módu	39
3.5.4.	HPLC analýza standardního roztoku hypericinu na chromatografických kolonách typu PFP a C18 v reverzním módu	40
3.6.	Stanovení hypericinu v částech třezalky tečkované	44
3.6.1.	Kvantifikace hypericinu v částech třezalky tečkované s využitím HPLC a UV-VIS detekce	44
3.6.2.	Identifikace hypericinu pomocí vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie.....	52
3.6.3.	Ověření čistoty chromatografických píků hypericinu pomocí HRMS.....	53
4.	Diskuze	58
	Závěr	61
	Seznam použitých zkratk.....	62
	Použité zdroje a literatura	64
	Přílohy.....	70

Úvod

Tato bakalářská práce se zaměřuje na separaci a analytické stanovení polyfenolických látek odvozených od antrachinonu v třezalce tečkované (*Hypericum perforatum L.*) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s detekcí založenou na měření absorpance v ultrafialové a viditelné části spektra optického záření (UV-VIS). Hlavním pracovním úkolem bylo především ověřit přínos stacionární fáze s pentafluorfenylovou skupinou (PFP) k separaci hypericinu ve srovnání s klasickou reverzní stacionární fází typu C18. Z důvodu spolehlivé identifikace studovaných látek a ověření čistoty chromatografických píků byla též prováděna i analýza pomocí hmotnostní spektrometrie (MS).

Pokud jde o výběr tématu, zadání bakalářské práce jsem zvolila proto, jelikož HPLC vnímám jako jednu z velmi perspektivních metod pro práci v oboru analytické a bioanalytické chemie. Chtěla jsem se naučit pracovat s kapalinovým chromatografem, vyvíjet vhodné metody pro separaci látek ve směsích a řešit problémy vzniklé při výzkumu bioaktivních látek v třezalce tečkované.

Struktura bakalářská práce je z metodologických důvodů rozdělena na dvě hlavní části. První je část teoretická, která je rozčleněna do čtyř podkapitol. V prvních dvou podkapitolách jsem se zabývala historickým vývojem samotné chromatografie jako vědeckého fenoménu. Dále pak principem této instrumentální metody a jejím rozdělením. Největší úsilí jsem věnovala přípravě části o HPLC, kde jsem uvedla klasifikaci stacionárních fází, elučních módů, retenční charakteristiky, účinnost chromatografické kolony, a v návaznosti na to i rozlišení a asymetrii píků. Vzhledem k zaměření bakalářské práce jsem také popsala vlastnosti a aplikaci stacionární fáze s pentafluorfenylovou (PFP) skupinou, jak to dovolila rešerše dostupné odborné literatury. Náplní následující podkapitoly je stručné pojednání o detekci pomocí MS, která zásadním způsobem přispívá k získání spektrálních dat, na jejichž základě lze určit identitu ionizovatelných chemických látek. Ve čtvrté podkapitole jsem uvedla základní informace o třezalce tečkované a látkách, které jsou v ní obsažené. Dále jsem představila i jejich chemické struktury, fyzikálně-chemické vlastnosti a jejich použití v lékařské praxi.

V experimentální části jsem se zabývala především vývojem metodiky pro chromatografickou separaci hypericinu od ostatních látek v methanolových extraktech vysušených částí třezalky tečkované. Hlavním cílem bylo srovnat separační vlastnosti chromatografických kolon Kinetex C18, 150 x 3 mm / 2,6 μm , 100 Å a Kinetex PFP, 150 x 4,6 mm / 5 μm , 100 Å. V rámci tohoto výzkumu jsem se především zaměřila na studium efektu různých mobilních fází na chromatografickou separaci (tj. normální, polárně organický a reverzní eluční mód). S využitím kapalinového chromatografu UHPLC Dionex Ultimate 3000 a hmotnostního spektrometru Q Exactive Plus jsem následně optimalizované HPLC metody použila ke kvantifikaci hypericinu ve vzorcích listu, květu, nati a kořene třezalky tečkované.

1 Teoretická část

1.1 Separační metody

Separační metody neodmyslitelně patří k analytické chemii. Jejich využití spočívá především v oddělování a identifikaci zkoumaného analytu ve směsi látek na základě odlišných fyzikálně-chemických vlastností [1]. Aplikace tradičních separačních metod v soudobém vědeckém výzkumu je ale leckdy obtížná, a proto je vhodné využít kombinace instrumentálních metod, které se vzájemně doplňují v přesnosti a správnosti stanovených dat. Tyto moderní kombinované separační metody nacházejí širokou škálu uplatnění, a to až v potravinářském, petrochemickém či farmaceutickém průmyslu [2].

Separační metody můžeme rozdělit na dvě podstatné skupiny. První skupinou je rozdělení podle druhu skupenských fází, mezi kterými dochází k separaci složek. Druhou skupinou je pak rozdělení podle druhu sil, které se na separaci primárně podílejí [3]. Přehled nejdůležitějších separačních metod a jejich principů je uveden v Tab. 1. Význam použitých zkratk je uveden v kapitole Seznam použitých zkratk.

Název metody	Princip separace
Destilace, chromatografie GLC	Rovnováha plyn-kapalina
Sublimace, chromatografie GSC	Rovnováha plyn-tuhá látka
Extrakce z kapaliny do kapaliny, chromatografie LLC, GPC, TLC	Rovnováha kapalina-kapalina
Srážení, frakční krystalizace, výměna iontů, pásmové tavení, chromatografie LSC, IEC, TLC ¹	Rovnováha kapalina-tuhá látka
Difúze plynů, dialýza, elektrodialýza, ultrafiltrace	Dělení na membráně
Hmotnostní spektrometrie, elektroforéza, termodifúze	Dělení účinkem pole
Extrakce	Rozdílná rozpustnost tuhých látek v kapalinách
Elektrolýza	Rozdílné rozkladné napětí elektrolytů

Tab. 1: Rozdělení separačních metod [1].

¹ Tenkovrstvá chromatografie (thin layer chromatography, TLC) může být provedena jako rozdělovací separační metoda v systému kapalina-kapalina (tj. kapalina je ukotvena na pevném nosiči) nebo jako absorpční metoda, kde je stacionární fází tuhá látka.

1.1.1 Chromatografické metody

1.1.1.1 Historický vývoj chromatografie

Ruský botanik M. Semjonovič Cvět² je považován za objevitele chromatografie. V roce 1905 prezentoval svůj objev a výsledky práce na schůzi Varšavské společnosti Přírodovědců ve Varšavě. Přestože popsal princip metody správně, nesetkal se jeho objev na schůzi Varšavské společnosti Přírodovědců s větším ohlasem [4].

Při své práci s pigmenty rostlin, převážně chlorofyly a karotenoidy, sestrojil sloupec s jemně rozemletým uhlíčanem vápenatým, což bychom dnes mohli považovat za stacionární fázi. Do takto sestaveného sloupce umístěného svisle dolů nanesl na vrchol extrakt z listových barviv a pomocí sirouhlíku, tedy mobilní fáze, protlačoval tyto extrakty skrz vápenec. Jednotlivé druhy chlorofylů se oddělily do pásů, které se lišily podle barevnosti. Po rozdělení pigmentů vytlačil sloupec vápence z nádoby, rozřezal jej podle barev, a následně látky, které se během procesu adsorbovaly na vápenec, vyextrahoval do roztoku [5].

V souvislosti s vývojem sloupcové kapalinové chromatografie se postupně objevily na scéně i další varianty, jako je papírová a plynová chromatografie. V případě plynové chromatografie byl použit místo kapalně mobilní fáze inertní plyn, což přineslo jak určitá úskalí, tak významné výhody při separaci směsí těkavých látek. Poprvé byla plynová chromatografie popsána v roce 1952. Britský chemik A. J. P. Martin a britský biochemik R. L. M. Synge provedli extrakci těkavých mastných kyselin z biologických vzorků a následně k jejich separaci použili plynovou chromatografii. Jako mobilní fáze byl použit dusík a jako stacionární fáze silikonový olej [6].

V současné době představuje nejvýznamnější chromatografickou metodu především vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Stručně lze zmínit, že se jedná o nepostradatelnou separační techniku v oblasti farmakokinetických analýz, proteomiky, metabolomiky, genomiky, toxikologie, potravinářství, petrochemického průmyslu a mnoha dalších oborech. Ve spojení s hmotnostní spektrometrií (tzv. LC-MS) náleží tato metoda mezi základní nástroje každé moderní analytické laboratoře jak v průmyslovém, tak akademickém prostředí. Charakterizaci HPLC bude proto věnována samostatná podkapitola.

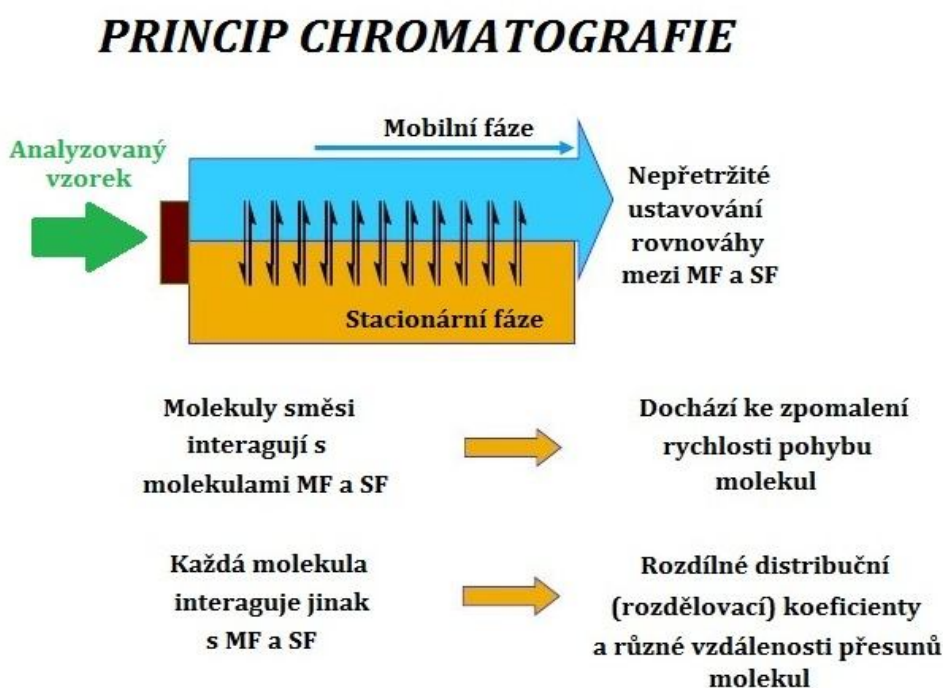
1.1.1.2 Princip chromatografie

Princip chromatografie lze obecně vystihnout jako důsledek rozdílných ne vazebných interakcí (tj. hydrofobní interakce, van der Waalsovy interakce, elektrostatické interakce, Londonovy dispersní síly, vodíkové můstky, tvorba π - π komplexů s přenosem náboje, aj.) dělených látek v systému dvou chemicky

² Michail Semjonovič Cvět (*14. 5. 1872 - †26. 6. 1919) byl významný ruský botanik, biochemik a fyziolog, který se narodil v italském městě Asti a vyrůstal v Ženevě. Roku 1896 získal na Univerzitě Ženeva titul Ph.D. za obhajobu disertační práce věnované výzkumu buněčné fyziologie.

odlišných prostředí [7]. Také lze říci, že princip chromatografie spočívá v nepřetržitém ustavování rozdělovacích rovnováh a distribuci složek dělené směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Analyty jsou tedy v bezprostředním kontaktu se dvěma různými nemísitelnými fázemi, ke kterým vykazují rozdílnou afinitu [8]. V jedné z fází chromatografického systému se pak analyt koncentruje, což může být využito k jeho více či méně selektivní separaci od ostatních složek. Tyto fáze mohou mít podobu pevné látky (s), kapaliny (l) nebo plynu (g), avšak v praxi se ze všech možných kombinací skupenských fází používají jen některá uspořádání.

V případě kapalinové chromatografie je mobilní fází (MF) kapalina. Stacionární fází (SF) může být pevná nebo kapalná látka, ukotvena na tuhém nosiči v chromatografické koloně [1]. Princip chromatografické separace je uveden na Obr. 1.



Obr. 1: Princip chromatografie [9].

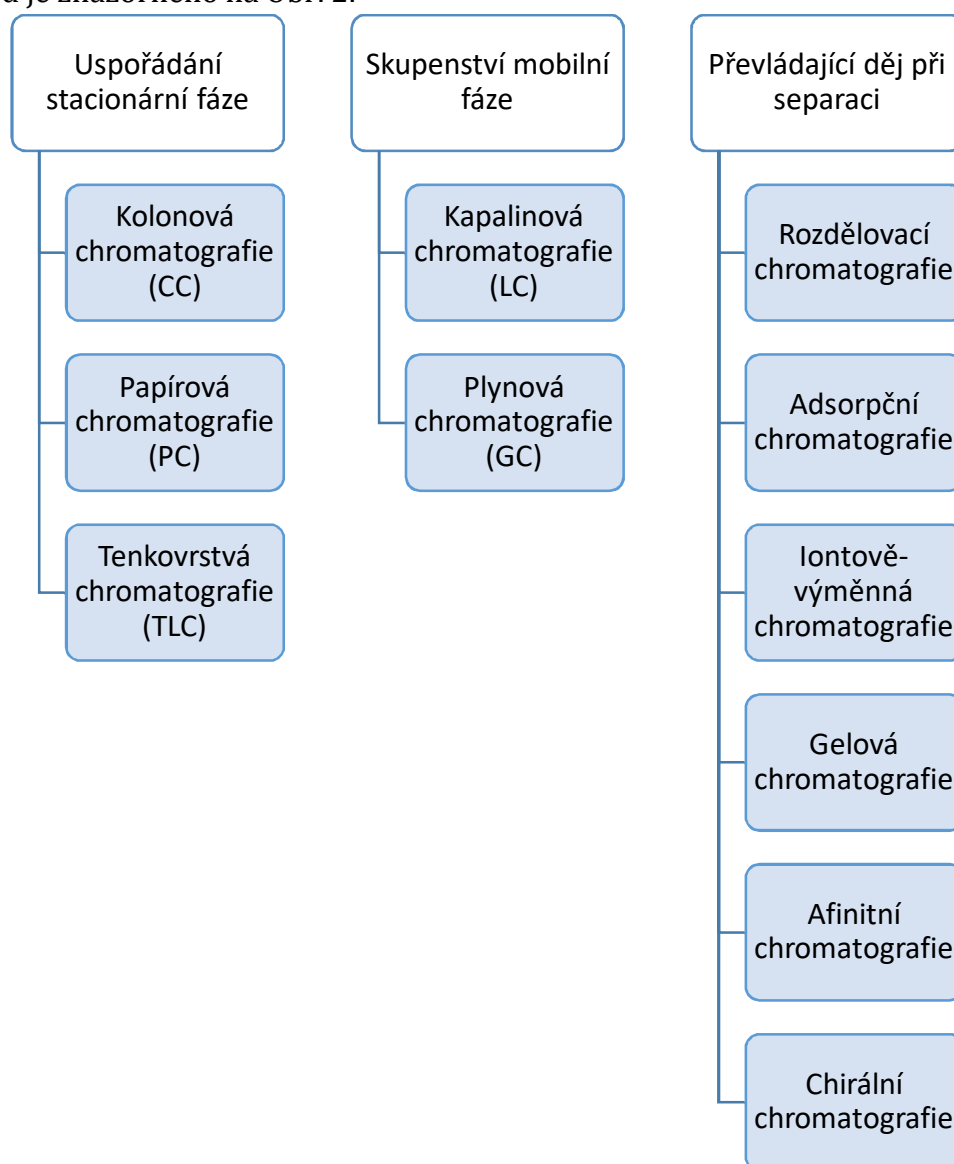
Distribuci dělených látek mezi mobilní a stacionární fází lze popsat distribuční neboli rozdělovací konstantou K_D (1):

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} \quad (1)$$

kde c_s je koncentrace složky ve stacionární fázi a c_m je koncentrace složky v mobilní fázi [10]. Čím je hodnota rozdělovací konstanty K_D pro určitou látku vyšší, tím déle se její molekuly zdržují ve stacionární fázi, a tím větší je její retence. Retenci v praxi vyjadřujeme pomocí retenčních, popř. retardačních faktorů, jak bude popsáno v dalších částech bakalářské práce. K dělení látek je nutné, aby se od sebe navzájem lišily svými distribučními (rozdělovacími) konstantami K_D [11].

1.1.1.3 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografie zahrnuje široké spektrum metod, které můžeme dělit podle principu separace, povahy fází, způsobu provedení, technického uspořádání a účelu. Principem separace může být rozdílná distribuční konstanta K_D , absorpční afinita, elektrostatické síly nebo velikost molekul analytů. Podle charakteru fází můžeme rozlišovat plynovou chromatografii (GC) nebo kapalinovou chromatografii (LC) a jejich varianty (např.: GLC, GSC, LLC, LSC, GPC). Chromatografie může být provedena vertikálně (na chromatografickém sloupci) nebo horizontálně (na papíru či na tenké vrstvě). Z hlediska technického uspořádání může být chromatografie provedena frontální, vytěšňovací nebo eluční technikou [1, 26]. Podle účelu lze chromatografii rozdělit na preparační (slouží k přípravě čistých látek) a analytickou (jejím cílem je kvalitativní a kvantitativní analýza vzorků). Základní dělení chromatografických metod je znázorněno na Obr. 2.



Obr. 2: Dělení chromatografických metod dle uspořádání stacionární fáze, skupenství mobilní fáze a převládajícího děje při separaci [10].

1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

K nejrozšířenějším typům kapalinové chromatografie patří vysokoučinná kapalinová chromatografie, HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). Jedná se o techniku analytické chemie, která slouží k separaci, identifikaci a kvantifikaci složek v různých směsích. Základem této instrumentální metody je dělení látek mezi stacionární (nejčastěji modifikovaný silikagel, v menší míře oxid hlinitý, oxid zirkoničitý, polystyrendivinylbenzen (PS-DVB) nebo grafit) a mobilní fázi (voda, pufr, acetonitril (ACN), methanol (MeOH) a jiná organická rozpouštědla) s neustálým ustavováním rovnováhy [12, 13]. HPLC se především zaměřuje na analýzu kapalných nebo v mobilní fázi rozpustných látek. Mezi její největší přednosti jednoznačně patří robustnost a vysoká selektivita, která umožňuje stanovit a identifikovat konkrétní látku i ve směsi dalších látek. Dále je to citlivost, malá spotřeba vzorku a také automatizovatelnost³ metody.

Ke kvalitativnímu stanovení HPLC využívá v první řadě retenční faktor, který je důsledkem fyzikálně-chemických vlastností daného analytu. Předpokladem je, že odlišné chemické struktury vykazují rozdílné interakce v systému stacionární a mobilní fáze, což se projevuje jejich rozdílnou retencí. V tomto ohledu je klíčový detektor, který je schopný v závislosti na koncentraci analytu reagovat na jeho přítomnost určitou kvantitativní odezvou [13]. V praxi se nejčastěji používá spektrofotometrický detektor (např. absorpční detektor s fixní vlnovou délkou, s proměnlivou vlnovou délkou nebo s diodovým polem), fluorescenční detektor, refraktometrický detektor, elektrochemický detektor (např.: amperometrický nebo coulometrický detektor), odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD), detektor nabitého aerosolu (CAD), vodivostní detektor nebo hmotnostní spektrometr. Obvykle se při HPLC postupuje tak, že se analyzuje standardní vzorek analytu za daných chromatografických podmínek, a určí se jeho retenční faktor, jakožto funkce času, který je potřeba k vymytí (eluci) analytu z chromatografické kolony do detektoru. Retenční faktor je tedy kvalitativním kritériem analytu [29].

Kvantitativní stanovení se pomocí HPLC může provádět čtyřmi způsoby [10]:

1. Metoda vnějšího standardu
2. Metoda přídatku standardu
3. Metoda vnitřního standardu
4. Metoda vnitřní normalizace

Nejběžnější formou kvantitativního stanovení je metoda vnějšího standardu, která se v praxi často nazývá kalibrační křivkou. Smyslem této metody je určit závislost mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu. Jako měřítko odezvy detektoru se nejčastěji používá plocha pod píkem analytu v chromatogramu. Kalibrační funkce se následně určuje lineární regresí hodnot ploch pod píkem a odpovídajících koncentrací pro 5 až 7 kalibračních standardů, přičemž každý

³ Schopnost přístroje provádět desítky až stovky analýz bez přítomnosti pracovníka. Tím zjednodušuje náročnost procesu analýzy a šetří čas pracovníků.

z těchto standardů se analyzuje 2 až 3krát. Koncentrace analytu v neznámém vzorku se určí dosazením do vypočítané kalibrační funkce (2):

$$A = kc + q \quad (2)$$

kde A je plocha pod píkem analytu v chromatogramu, k je faktor citlivosti detektoru na analyt, c je koncentrace analytu a q je úsek na ose y , který vyjadřuje odezvu detektoru při nulové koncentraci analytu. Data získaná během kalibrace se statisticky zpracovávají, aby bylo možné kvantitativně charakterizovat linearitu, přesnost, správnost, horní a dolní mez kvantifikace vyvinuté analytické metody.

Protože při metodě vnějšího standardu může docházet k výskytu různých chyb (např.: nesprávné odměřování kapalin a odpařování rozpouštědla), používají se v HPLC separaci další kvantifikační metody, kdy se ke vzorku přidává např. známé množství zkoumaného analytu nebo tzv. vnitřního standardu [13]. Kvantifikaci přídatku standardu zkoumaného analytu nebo vnitřního standardu je možné určit chyby, ke kterým během analýzy dochází, a ty pomocí matematických operací z výsledných hodnot koncentrací stanovovaných látek eliminovat. Podrobnější informace o těchto metodách, lze nalézt v citované odborné literatuře [29].

1.2.1 Základní parametry chromatografické separace

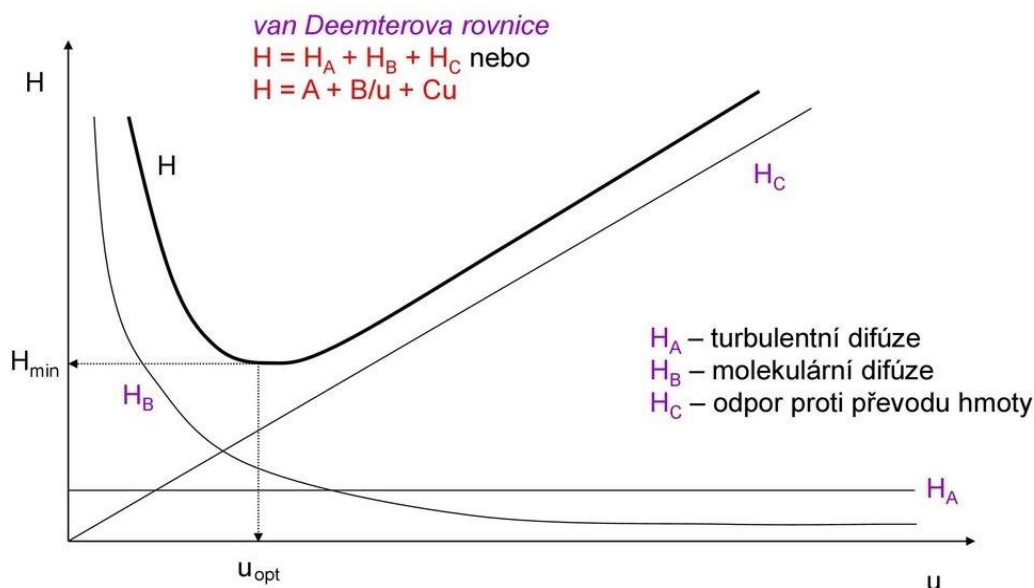
1.2.1.1 Van Deemterova rovnice

Pokud hovoříme o fyzikálních principech HPLC, je nutné se alespoň stručně zmínit o van Deemterově rovnici, která charakterizuje účinnost chromatografické separace v systému stacionární a mobilní fáze (3):

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{u} + \frac{f(k)d_p^2 u}{D_m} \quad (3)$$

V této rovnici (3) představuje H výškový ekvivalent teoretického patra, A je příspěvek vířivé difúze k H , B je příspěvek molekulární difúze analytu k H , C je příspěvek odporu proti přenosu hmoty k H , λ je koeficient nerovnoměrného plnění chromatografické kolony, γ je korekční faktor charakterizující tvar kanálků v koloně, d_p je průměr částic náplně kolony, D_m je difúzní koeficient, u je lineární rychlost MF, $f(k)$ je funkce zahrnující efekt distribuce velikosti, tvaru částic a pórů SF [10].

Zjednodušeně lze říci, že čím je veličina H nižší, tím je chromatografická separace účinnější. Hodnotu H lze snížit například zmenšením velikosti částic SF nebo zvýšením průtoku MF. Avšak jak vyplývá z rovnice (3), vztahy mezi jednotlivými parametry van Deemterovy rovnice jsou velmi komplexní a optimální hodnoty průtoku vzhledem k velikosti částic stacionární fáze je pro konkrétní chromatografický systém nutné stanovit experimentálně (Obr. 3).



Obr. 3: Van Deemterova křivka, minimální hodnoty H_{min} a optimální průtoková rychlost u_{opt} [12].

1.2.1.2 Retenční faktor, retenční čas a retenční objem

Podstatnou veličinou charakterizující jakoukoli dělenou látku je eluční neboli retenční čas t_R a objem V_R . Jak uvádí Lucie Nováková a kol. [10]: „retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky (vrcholu píku)“. Retenční objem je pak objem mobilní fáze, která proteče kolonou za tuto dobu. Mezi těmito veličinami existuje matematický vztah (4):

$$V_R = F_m \cdot t_R \quad (4)$$

kde F_m je objemová rychlost průtoku mobilní fáze [ml/min], V_R je retenční objem [ml] a t_R je retenční čas [min]. Další důležitou veličinou je retenční či kapacitní faktor k , který je mírou retence dělených látek a lze jej vyjádřit pomocí retenčního času t_R nebo objemu V_R . Rovnice pro retenční faktor je následující (5):

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0} \quad (5)$$

kde t_R je retenční čas analytu, t_0 je mrtvý retenční čas, V_R je retenční objem analytu a V_0 je mrtvý retenční objem. Jak mrtvý retenční čas, tak mrtvý retenční objem se vztahuje k eluci látky, která se v chromatografickém systému nezadržuje a vychází z něj na čele MF. Tyto hodnoty t_0 a V_0 lze na reverzní fázi stanovit například pomocí analýzy vzorku acetonu. Z této rovnice také vyplývá na první pohled překvapivý fakt, že všechny látky, dělené tímto způsobem, stráví v MF naprosto stejný čas, a naopak se odlišují časem, který stráví ve SF [15].

1.2.1.3 Účinnost chromatografické kolony

Primárním cílem metody HPLC je dosáhnout co nejlepší separace látek za co nejkratší čas. Účinnost chromatografické kolony je zásadním ukazatelem kvality chromatografické separace. Je to zároveň hodnotící prvek pro míru rozšiřování elučních zón [16].

Účinnost chromatografické kolony je charakterizována bezrozměrnou veličinou nazývanou počet teoretických pater, kterou značíme N anebo výškový ekvivalent teoretického patra H , jak bylo uvedeno v kapitole o van Deemterově rovnici. Čím vyšší je u zkoumané látky počet teoretických pater N , tím je použitá kolona v separaci účinnější [17]. Tato veličina ovšem není konstantní pro určitou kolonu, ale mění se dle retenčního faktoru použité látky, viskozity MF, také je závislá na stavu SF, délce kolony a na velikosti částic náplně chromatografické kolony. Obecně lze počet teoretických pater vyjádřit pomocí složitějšího vzorce, a proto se v praxi používá jednodušší vzorec (6):

$$N = konst. \left(\frac{V_R}{w} \right)^2 \quad (6)$$

kde V_R je retenční objem a w je šířka píku v dané výšce. Při zjišťování účinnosti chromatografické kolony pomocí počtu teoretických pater je vždy nezbytně nutné uvádět délku použité kolony, a to z toho důvodu, aby bylo jasné, s jakou kolonou bylo dosaženo takového počtu pater (N/m) [18].

Ke srovnávání kolon o různých délkách je používán tzv. výškový ekvivalent teoretického patra H (uvedeno v kapitole o van Deemterově rovnici) [19]. Výškový ekvivalent teoretického patra H lze též formulovat jako délku kolony, která je vztažena na jedno patro (7):

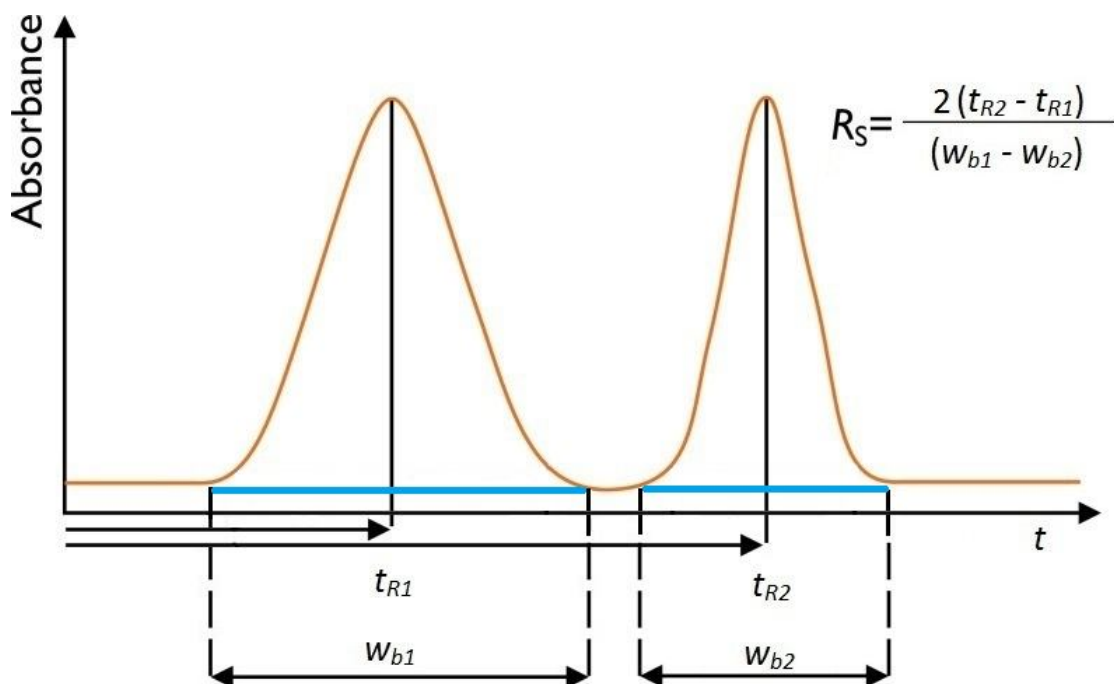
$$H = \frac{L}{N} \quad (7)$$

1.2.1.4 Rozlišení a asymetrie píku

Rozlišení chromatografického píku je chápáno jako relativní míra separace, která odpovídá míře vzájemného překryvu dvou sousedních píků (8):

$$R_{1,2} = \frac{2 \cdot (t_{R1} - t_{R2})}{w_{b1} + w_{b2}} = \frac{2 \cdot \Delta t_R}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (8)$$

kde $R_{1,2}$ charakterizuje rozlišení píků 1 a 2, t_{R1} a t_{R2} jsou retenční časy těchto píků. Δt_R je rozdíl hodnot retenčních časů a w_{b1} , w_{b2} jsou šířky píků na základní linii (baseline), jak je zřejmé z Obr. 4 [20].



Obr. 4: Grafické znázornění rozlišení chromatografických píků [20].

Pro matematické vyjádření rozlišení píků můžeme využít různé vzorce. Ty se ovšem nepatrně mění v závislosti na použité definici (např. Evropská standardní definice (ES), definice Spojených států amerických (US) atd.) Jelikož chromatogramy, které jsou uvedeny v této bakalářské práci, jsou zpracovány programem Chromeleon 6.80, který využívá definici ES, uvádím zde i vzorec, který byl při zpracování chromatogramů použit (9):

$$R_{1,2} = 1,18 \cdot \frac{(t_{R1} - t_{R2})}{\frac{w_{1,1}}{2} + \frac{w_{1,2}}{2}} \quad (9)$$

Další využitelnou veličinou je asymetrie píku, na základě, které můžeme určit stupeň kvality chromatografické separace [21]. Pro vyjádření asymetrie píku existují dvě metody, a to faktor chvostování píku, který označujeme T_f a je vyjádřen šířkou píku v 5 % výšky ($w_{0,05}$) ke dvojnásobku vzestupné části šířky píku (10):

$$T_f = \frac{w_{0,05}}{2f} \quad (10)$$

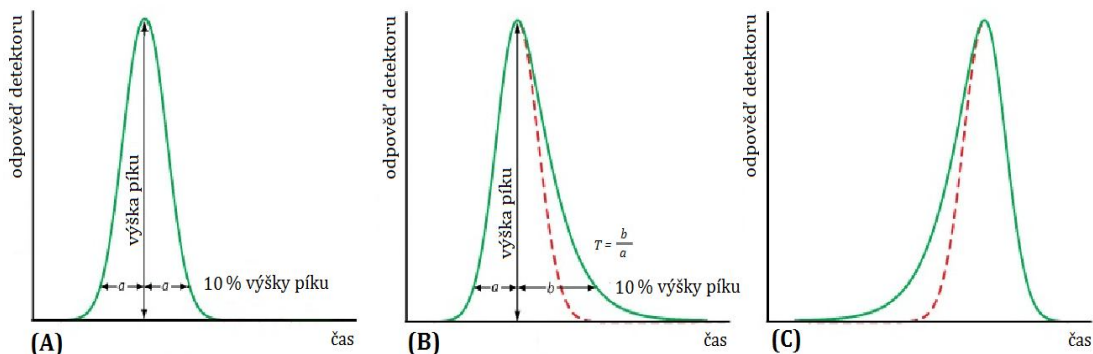
nebo faktor asymetrie A , který vyjadřuje poměr šířky sestupné části píku t , což znamená tailing, k vzestupné části píku f , jež znamená fronting (11):

$$A = \frac{t}{f} \quad (11)$$

Pro vyjádření vztahu mezi faktory chvostování a asymetrie platí následující rovnice (12):

$$A = 2T - 1 \quad (12)$$

Čím více se hodnota asymetrie blíží k číslu 1, tím je symetrie píku ideálnější. Pokud dojde k tomu, že faktor asymetrie je >1 , pak hovoříme o chvostování píku. Naopak pokud je faktor asymetrie <1 , nazýváme tento jev frontování píku tzv. hrnutí (Obr. 5) [22].



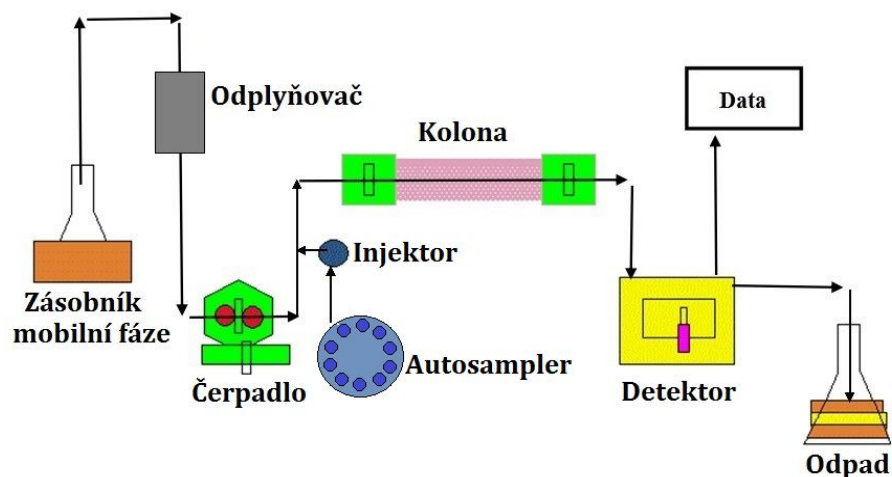
Obr. 5: Znárodnění gaussovského píku (A), chvostujícího píku (B) a frontujícího píku (C) [23].

Při reálné separaci velmi často dochází k rozmývání píků, a tím k tvorbě nedokonale oddělených píků, které nemají zřetelně ohraničené kontury [23]. Příčiny rozmývání mohou mít různé důvody (např.: vířivá difúze, podélná molekulární difúze, odpor vůči přenosu hmoty). Tyto děje mohou mít významný vliv na výsledný tvar píku, a tím i na účinnost separace celé chromatografické metody [24].

1.2.2 Instrumentace v HPLC

Pro HPLC separaci používáme přístroj nazývaný chromatograf. Běžný chromatograf se skládá z následujících částí, které jsou znázorněny na Obr. 6.

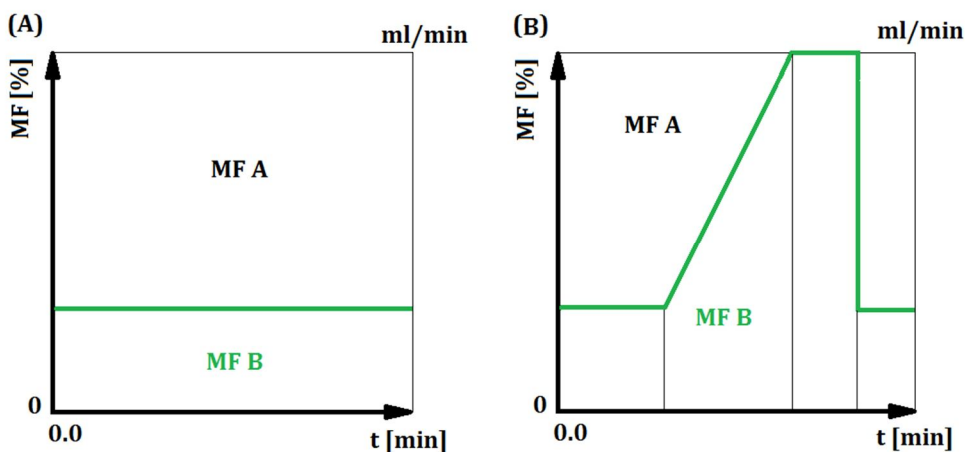
První částí systému jsou zásobníky mobilních fází, které mají funkci uchování a transportu MF. Důležitým prvkem je vakuový odplyňovač, který je zásadní kvůli odstranění bublinek rozpuštěných plynů v MF, a to především z toho důvodu, aby nedocházelo k uvolnění bublinek plynů při změně tlaku na výstupu z chromatografické kolony. Odplyněním MF můžeme předejít nejrušnějším problémům. Odplyňovač může být součástí chromatografu nebo může být MF odplyněna mimo přístroj pomocí podtlaku, probubláváním pomocným plynem (dusík, helium) nebo ultrazvukem (UZ). Nedílnou součástí systému HPLC je chromatografické čerpadlo [25]. Tato část přístroje udržuje konstantní průtok MF v celém systému. Čerpadla musí být konstruována tak, aby byla použitelná při velmi vysokém tlaku. Další částí je dávkovací ventil, který umožňuje vstup rozpuštěného a odplyněného vzorku do MF. Nejčastěji je používán šesticestný ventil. Dávkovací ventil bývá zabudován přímo do termostatového autosampleru a umožňuje manipulaci s tokem MF během probíhající analýzy. Mobilní fáze je dále vedena přes zařízení pro dávkování vzorku, autosampleru, až do chromatografické kolony, která je přímo spojena s detektorem. Chromatografická kolona je umístěna v kolonovém termostatu s nastavitelnou teplotou na koloně [26].



Obr. 6: Schéma HPLC chromatografu [25].

1.2.3 Typy eluce

Na izolaci a vyplavení jednotlivých složek ze směsi má vliv povaha stacionární i mobilní fáze. Eluci můžeme rozdělit na dvě základní varianty, a to isokratickou a gradientovou (Obr. 7). Retenční charakteristiky pro isokratickou a gradientovou eluci jsou zcela odlišné [27]. Při isokratické eluci zůstává složení mobilní fáze stále stejné, tzn. že eluční síla je stále stejná. Naopak při eluci gradientové dochází ke změně složení mobilní fáze, a to obvykle tak, aby vzrostla její eluční síla. Pokud mají látky podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, je vhodné použít isokratickou eluci, a naopak pro látky s poměrně odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi je výhodnější eluce gradientová [28].



Obr. 7: Znázornění isokratické (A) a gradientové (B) eluce.

Gradientovou eluci je možné dále rozdělit na další dva typy, a to na vysokotlakou a nízkotlakou. Při analýze, ve které je použit vysokotlaký gradient, je každá z mobilních fází nasávána svým vlastním čerpadlem a k mísení takto nasátých mobilních fází dochází ve směšovacího zařízení za vysokého tlaku, za čerpadlem [29]. Tento systém má přínos zejména v tom, že má malý mrtvý objem a lze jej využít

pro tvorbu rychlých gradientů. Při nízkotlakém gradientu jsou mobilní fáze nasávány jedním čerpadlem a k jejich mísení dochází ve směšovacím zařízení za atmosférického tlaku, před čerpadlem. Tento typ gradientové eluce se vyznačuje vysokou přesností. Přesnost je ovšem podmíněná pracovní synchronizací periody ventilů s čerpadly a také odvzdušněním MF.

Při vývoji a optimalizaci chromatografických metod se používají různé obměny mobilních fází, které můžeme klasifikovat do tří elučních módů:

- 1. Normální mód**
- 2. Polárně organický mód**
- 3. Reverzní mód**

Každý z těchto tří módů lze využít na jakékoli chromatografické koloně, pokud jsou použita rozpouštědla v MF, dle výrobce, kompatibilní se SF [30].

Pro normální eluční mód je charakteristické použití alifatických uhlovodíků (např. hexan, heptan) ve směsi s alifatickými alkoholy (např. methanol, ethanol, propan-2-ol, butan-1-ol). Pro separaci látek v normálním módu se běžně používají polární stacionární fáze (např. silikagel, alumina), ačkoli může být použita i reverzní fáze. Jako mobilní fáze lze použít takové, které mají podstatně nižší polaritu než fáze stacionární. Retence látek klesá se vzrůstající koncentrací polárního rozpouštědla v mobilní fázi, a naopak se zvyšuje s rostoucí polaritou zkoumaného analytu [10].

Polárně organický mód využívá mobilní fáze s majoritním podílem acetonitrilu (ACN) nebo alifatických alkoholů. Kromě toho se do mobilní fáze v polárně organickém módu přidávají i polarizační aditiva, jako je triethylamin (TEA), kyselina mravenčí (FA), kyselina octová (AA), kyselina trifluoroctová apod. [10].

V reverzním módu se používá jako charakteristická složka MF voda, popř. vodný pufr, a dále s vodou mísitelná organická rozpouštědla, jako je ACN nebo MeOH. Reverzní eluční mód běžně využívá také polarizační aditiva jako v případě polárně organického módu (např. FA, TEA). V reverzním módu má obvykle stacionární fáze nepolární charakter (např.: silikagel nebo kovové oxidy s navázanými alkylovými řetězci). Lze použít i propylaminové a propylkyanové stacionární fáze, avšak pouze v kombinaci s některými mobilními fázemi. MF je tedy v tomto případě polární. S klesající polaritou organického rozpouštědla roste eluční síla mobilní fáze [10].

Pokud není předem známa vhodná MF (např. z odborné literatury), lze pomocí těchto tří elučních módů provést screening, a nalézt tak optimální HPLC metodu pro separaci zkoumaných analytů [31].

1.2.4 Typy stacionární fáze

Obecně je stacionární fáze tou částí chromatografického systému, která je nepohyblivá. SF může mít buď charakter tuhé látky, nebo kapaliny ukotvené na tuhém nosiči. SF tvoří výplň chromatografické kolony, na které se realizuje separační proces [32].

Dělit stacionární fáze můžeme hned z několika hledisek:

- Podle skupenství, a to kapalné (LLC) a tuhé (LSC)
- Podle polaritý fáze, která může být buď polární, nepolární nebo amfoterní (obojetná)
- Podle jejich chemického složení na anorganické oxidy (silikagel, oxid zirkoničitý, oxid hlinitý a oxid titaničitý), chemicky vázané fáze na bázi silikagelu, polymerní, hybridní a stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku.

Pro stacionární fáze obecně platí určité požadavky, které by měly splňovat. Je nutné, aby SF byly chemicky a tepelně stabilní. Nesmí nikterak reagovat s MF, ani v ní nesmí být rozpustné [33]. Další rozdělení SF je uvedeno v Tab. 2.

Silikagel	
Chemicky vázané fáze na bázi silikagelu	
	Fáze s chemicky vázanými alkyly
	Fáze s aminopropylovou a kyanopropylovou skupinou
	Diolová fáze
	Nitrofenylová a pentafluorfenylpropylová fáze
	Chemicky stabilní silikagelové fáze
	Silikagelové fáze pro separace s MF s vysokým obsahem vody
Stacionární fáze na bázi kovových oxidů	
	Oxid hlinitý
	Oxid zirkoničitý
Polymerní stacionární fáze	
	Polystyrendivinybenzen (PS-DVB)
	Anorganické nosiče pokryté polymerem
	Ostatní polymerní stacionární fáze
Hybridní stacionární fáze	
Stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku	

Tab. 2: Přehled typů stacionárních fází [10].

1.2.4.1 Reverzní fáze na bázi silikagelu s oktadecylovými řetězci

U tzv. obrácené fáze na bázi silikagelu s C18 řetězci je mobilní fází obvykle polární látka. Může to být např. směs vody, pufrů nebo zředěných vodných roztoků kyselin či bází s polárními organickými rozpouštědly. Příkladem mohou být látky mísitelné s vodou, a to alkoholy nebo ACN. Naopak SF bude nepolárního rázu [34].

Reverzní fáze je charakterizována jako dlouhý uhlíkatý řetězec, který je navázán na povrch silikagelu. Silikagel je z mnoha hledisek výhodný nosič [10]. Na Obr. 8. jsou znázorněny některé výhody použití silikagelu.

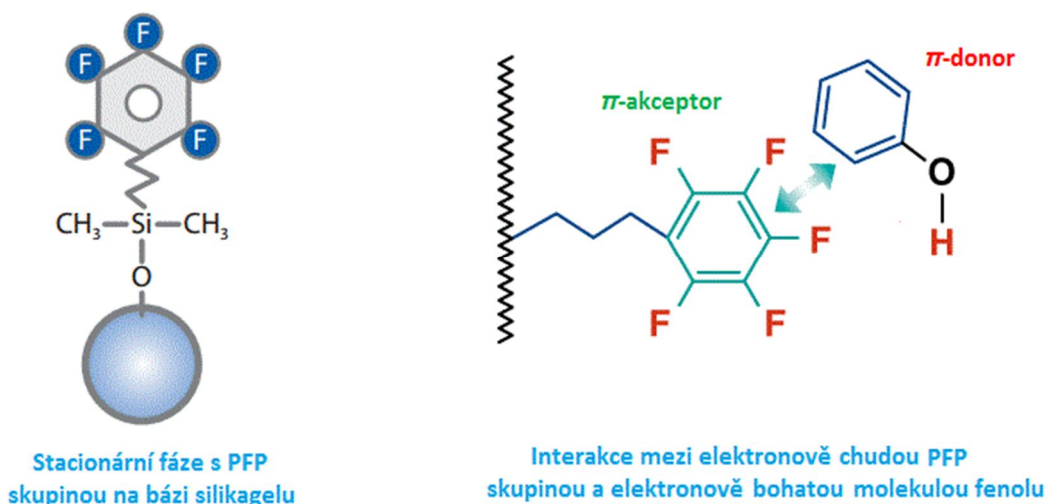


Obr. 8: Znázornění výhod použití silikagelu ve formě sorbentu [10].

1.2.4.2 Reverzní fáze na bázi silikagelu s pentafluorfenylovou skupinou

Oddělování látek pomocí reverzní fáze na bázi silikagelu s pentafluorfenylovou skupinou je obdobné jako u reverzní fáze, která je tvořena klasickým silikagelem s oktadecylovými řetězci. Na rozdíl od reverzní fáze C18 se při použití PFP fáze v chromatografické separaci předně uplatňují π -donorové a π -akceptorové interakce mezi pentafluorfenylovým jádrem a aromatickými molekulami analytů. Vedle π - π interakcí se při retenci na stacionární fázi s PFP uplatňují také hydrofobní interakce, dipól-dipólové interakce, vodíkové vazby (tj. mezi atomem fluoru PFP skupiny a donorem vodíkové vazby v analytu) a geometrická selektivita [10, 35].

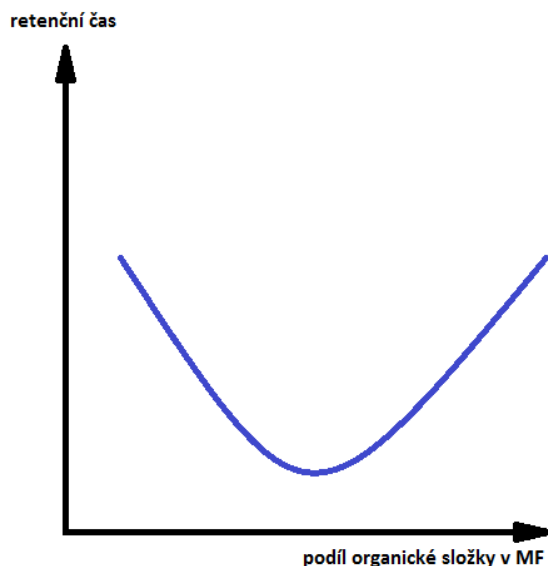
Jelikož fenylové jádro v PFP obsahuje 5 velmi elektronegativních atomů fluoru, je tento aromatický kruh elektronově deficitní a působí jako Lewisova kyselina, která přitahuje jiné molekulární systémy s bohatou polarizovatelnou elektronovou hustotou. Optimální je tedy interakce mezi PFP fází a deriváty benzenu s elektrondonujícími skupinami (tj. skupiny s kladným mezomerním elektronovým efektem $M+$, jako je kupříkladu metylová skupina nebo hydroxylová skupina), protože v tomto případě může dojít k tzv. sendvičové interakci s analytem, která je poměrně energeticky stabilní a podmiňuje nejsilnější retenci (Obr. 9).



Obr. 9: Struktura stacionární fáze s PFP skupinou a model π - π interakce s molekulou fenolu. PFP skupina obsahuje elektronově deficitní aromatický kruh, a naopak elektronově bohaté atomy fluoru [70, 71].

Z tohoto můžeme odvodit, že PFP fáze má ve srovnání s fází C18 odlišnou selektivitu, jak v normálním, tak reverzním elučním módu. Základní charakteristikou PFP je zejména vyšší selektivita vůči aromatickým látkám. Běžné lipofilní molekuly naproti tomu vykazují na PFP fázi sníženou retenci. Pokud má molekula analyzovaného vzorku ve své struktuře fluor, potom se na fluorované stacionární fázi bude značně silně zadržovat a její separace proběhne s vynikající selektivitou. Další výhodou této SF je možnost využití až 100 % vodné MF, aniž by hrozil kolaps stacionární fáze, a to v rozsahu pH od 2,0 až do 8,0 a teploty až do 70 °C. Lze tedy bez obtíží pracovat v normálním, polárně organickém i reverzním módu, včetně módu hydrofilní interakční chromatografie (HILIC). [35, 36].

U chromatografických kolon s PFP skupinou se většinou k propojení se silikagelovou bází používá propylový řetězec a nepokryté silanolové skupiny se endkapují trimethylsilylovou skupinou (TMS). Fluorované stacionární fáze vykazují též zajímavý retenční profil, protože během zvyšování eluční síly rostoucím podílem organické složky v mobilní fázi dochází nejprve ke snižování retence u některých polárních analytů, avšak po dosažení kritického bodu s minimální retencí dochází k nárůstu retence. Jedná se o tzv. U eluční profil znázorněný na Obr. 10.



Obr. 10: Retenční U-profil na fluorované stacionární fázi [10].

1.3 Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie

Při analýzách HPLC se hojně využívá tandemového spojení kapalinového chromatografu s hmotnostními spektrometry jako detektory (spojení se nazývá LC-MS). Díky tomu získáme jak iontové chromatogramy vyjadřující závislost intenzity signálu detekovaných složek v závislosti na čase, tak i spektrální údaje o identitě zkoumané látky. Hmotnostní spektrometr patří mezi detektory, které mohou potvrdit identitu analytu, a to na základě přesné molekulové hmotnosti a strukturně specifických fragmentů. Výhodami zapojení LC-MS jsou především: větší jistota identifikace látek (retenční čas a strukturní informace MS), možnost analýzy spletených směsí, menší spotřeba vzorku, zlepšení kvality spektrálních dat a další [37].

Celý postup identifikace a kvantifikace látek hmotnostním spektrometrem probíhá ve 3 krocích. V první řadě musí dojít k ionizaci vzorku, to znamená, že neutrální molekuly analytů, které mají být v MS detekovány, je nutné převést na nabitě molekuly. Tomuto lze velmi napomoci mobilní fází, pokud je analyt acidobazicky aktivní. Kyselé MF zvyšují podíl konjugovaných kyselin u bazických analytů (např. aminy) a bazické MF naopak zvyšují koncentraci konjugovaných bází v případě kyselých analytů (např. karboxylové kyseliny nebo fenoly) [38]. S polarizací iontů analytů v mobilní fázi se dobře kombinují tzv. měkké ionizační techniky, jako ionizace elektrosprejem (ESI), chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI) nebo fotoionizací za atmosférického tlaku (APPI), které bez destrukce molekul přivádějí ionty do hmotnostního spektrometru. Když analyt neobsahuje ionizovatelné funkční skupiny, je nutné aplikovat tvrdé ionizační techniky, jako je například elektronová ionizace.

Ve spojení LC-MS se mobilní fáze zpravidla přímo podílí na ionizačním procesu, proto nelze použít obvyklé mobilní fáze pro HPLC. Vhodnými mobilními fázemi jsou těkavá rozpouštědla s přísadkou těkavých aditiv o velmi nízké koncentraci. Příkladem může být například ACN nebo MeOH s přísadkou kyseliny mravenčí nebo octové o koncentraci < 1 % nebo < 10 mM. Nelze použít MF, které obsahují aditiva s vysokou teplotou varu, protože by došlo k nadměrnému zanesení a poškození hmotnostního spektrometru (jedná se např. o klasické fosfátové pufrů a jiné anorganické soli).

Po ionizaci a odpaření v iontovém zdroji se ionty rozdělí podle poměru m/z (hmotnost/náboj) a zároveň dojde k urychlení iontů rozdělených podle m/z v analyzátoru. Poslední krok zahrnuje detekci iontů a zesílení signálu v detektoru. Souběžně s tímto krokem dochází ke sběru a zpracování dat pomocí příslušného softwaru počítače [39].

V současné době je možné využívat několika typů analyzátorů, jejichž funkce je založena na odlišných principech. Některé analyzátory fungují rovněž jako detektory (např. orbitrap nebo cyklotron). Je možné analyzovat a separovat ionty na základě zakřivení dráhy v magnetickém poli, pomocí rozdílné oscilace iontů v elektromagnetickém poli, odlišné doby potřebné k průletu iontů určitou vzdáleností nebo rozdílné frekvence harmonických oscilací iontů [10].

Hmotnostní spektrometr může pracovat v režimu full-scan (FS), kdy se monitoruje intenzita iontů v širokém rozmezí m/z nebo se může detekce zúžit na malý interval např. o šířce 0.4 m/z , kdy se zachycuje jen jeden iont, tzv. single ion monitoring (SIM). Ionty mohou být také vedeny v hmotnostním spektrometru do kolizní cely, kde dochází po střetu s molekulami kolizního plynu (např. dusík) k fragmentaci molekul analytů. Fragmentovány mohou být opět ionty v širokém rozsahu m/z , tzv. all ion fragmentation režim (AIF) anebo může být sledován rozpad pouze jednoho prekurzorového iontu, tzv. single reaction monitoring (SRM). Některé hmotnostní spektrometry umožňují také provádět cykly fragmentací, kdy se ze spektra primárních produktových iontů vybírají nové prekurzory pro další fragmentaci (jde o tzv. MSⁿ) [40].

1.4 Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum L.*)

1.4.1 Historie použití třezalky tečkované

Třezalka tečkovaná byla dříve označována za „magickou“ rostlinu nebo také „všelék“. Toto označení získala díky tomu, že rozkvétá v době slunovratu, přesněji po nejdelším dni v roce (na severní polokouli nastává okolo 21. června), a také pro své širokospektrální léčivé účinky. V souvislosti s tím jí byla připisována schopnost odvracet neštěstí. Taktéž se jí říkalo bylina svatého Jana, svatojánské kvítí nebo čarovník [41].

Dříve byla třezalka tečkovaná vyhledávaným pomocníkem v léčitelství převážně k hojení různých poranění, zhmoždění a popálenin. Užívala se jak zevně, v podobě zábalů a olejů, tak vnitřně jako čaj [42].

1.4.2 Botanické vlastnosti třezalky tečkované

Třezalka tečkovaná (Obr. 11) je trvalá bylina, která patří do čeledi třezalkovitých (*Hypericaceae*) [42]. Její stonek je zaoblený, holý a vzpřímený. V horní části je stonek bohatě rozvětvený. Dosahuje výšky až 80 cm. Listy třezalky tečkované jsou celokrajné, podlouhlé, jehlicovité a přisedlé ke stonku. Na listech jsou především charakteristické průsvitné tečky, což jsou žlázy, které obsahují barvivo hypericin. Třezalka tečkovaná vytváří složité květenství seskupené ze zlatožlutých květů s volnými lupínky o průměru 2 - 2,5 cm. Plodem je tobolka, na které jsou taktéž žlázy [43]. Chutná hořce a je bez jakékoliv vůně.

Výskyt této byliny je podmíněn světlem. Najdeme ji tudíž na světlých místech jako jsou pastviny, paseky, okraje lesů, louky. Je rozšířená po celé Evropě, Severní Americe a části Asie, z přírody ovšem pomalu mizí [44].



Obr. 11: Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum L.*) [45, 46].

1.4.1 Farmaceutické využití třezalky tečkované

Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum L.*) byla často používána v tradiční medicíně zejména při léčbě psychogenních poruch, jako jsou deprese, úzkost, nespavost, rozrušení, neuralgie, migréna, bolesti zad, noční pomočování, neklid nebo traumatické poškození nervů [47]. Nicméně léčebný potenciál této rostliny je značně široký a lze ji použít také při infekcích, zánětech, arytmii, ekzémech, popáleninách, vředech, průjmu, astmatu, bronchitidě, chřipce, hemeroidech a mnoha dalších onemocněních [48].

Jednou z charakteristických vlastností účinných látek v třezalce tečkované je schopnost způsobit fotosenzibilizaci⁴. Ve stručnosti lze říci, že látky, které tento jev způsobují, se nazývají fotodynamické, fotosenzibilizující nebo též fototoxické. Jde o barevné látky, které jsou schopné fluorescence, to znamená, že jsou schopny absorbovat, krátkou dobu udržet a vyzářit přijatou světelnou energii. Absorbci

⁴ Fotosenzibilizace je zcitlivění organismů vůči slunečnímu záření při kontaktu s některými látkami, např. látka hypericin obsažená v třezalce tečkované.

energie obecně vznikají aktivované molekuly fotodynamické látky, které jsou ovšem aktivovány pouze určitou vlnovou délkou záření. Slunce má schopnost aktivovat celou řadu fotosenzibilizujících látek, a to z toho důvodu, že vysílá záření o vlnových délkách od 290 do 1850 nm [72, 73].

V současném výzkumu rakoviny byly také objeveny některé přínosné vlastnosti hypericinu, jakožto jedné z nejvýznamnějších bioaktivních látek v třezalce tečkované. Tato látka se po podání hromadí v nádorových tkáních, a může tak sloužit jako fluorescenční marker v diagnostice rakoviny. Ve fotodynamické terapii rakoviny je možné pomocí světla (např. laserovým paprskem) transformovat hypericin na reaktivní sloučeniny, které usnadňují odstranění rakovinných buněk prostřednictvím aktivace apoptózy nebo autofagie [49].

Z farmakologického pohledu byla pozornost předně věnována pochopení mechanismů účinku polyfenolů z třezalky tečkované při indukcii antidepresivních efektů na centrální nervový systém (CNS). Prvotní pracovní hypotézy předpokládaly, že antidepresivní účinek extraktů třezalky tečkované je způsoben inhibicí monoaminoxidázy (MOA) hypericinem [50]. Další biochemické studie ovšem zjistily, že je to primárně hyperforin, jakožto degradační produkt hypericinu, který může inhibovat serotoninergní systém, omezovat vstřebávání dopaminu, γ -aminomáselné kyseliny nebo *L*-glutamátu [51]. Soudobé studie také poukázaly na to, že hyperforin a jemu podobné sloučeniny mohou inhibovat arachidonát 5-lipoxygenázu, cyklooxygenázu 1, katechol-*O*-methyl transferázu, protein mnohočetné lékové rezistence 2 (multidrug resistance-associated protein 2), *N*-methyl-*D*-aspartátový receptor, dále snižovat expresi β_1 adrenergických receptorů, podporovat efluxní proces s *P*-glykoproteinem, ale též působit závažné lékové interakce, které mohou mít život ohrožující účinek při určitých podmínkách [52].

I když třezalka tečkovaná produkuje řadu bioaktivních látek (např. hyperosid, rutosid, rutin, quercetin, isoquercetin, naftodiantrony, floroglucin, amentoflavon, biapigenin, kyselina kávová, kyselina chlorogenová, *p*-kumarychininová kyselina, procyanidin B₂, α -pinen, karyofylen, atd.), převážná většina publikovaných farmakologických studií se zabývá hypericinem, pseudohypericinem a hyperforinem [53].

1.4.2 Aplikace HPLC ve studiu látek z třezalky tečkované

Za účelem stanovení farmakokinetického profilu látek z třezalky tečkované v různých biologických matricích byly vyvinuty a použity zejména metody založené na vysokoúčinné kapalínové chromatografii (HPLC)[54-62]. Například Biber a kol. [54] vyvinuli a validovali metodu HPLC pro kvantifikaci hyperforinu v lidské plazmě s využitím UV-VIS a MS detekce. Metoda byla založena na isokratické eluci (MF: 75 % ACN, 25 % H₂O, 0,255 % H₃PO₄) v reverzním režimu na koloně s endcappovaným, oktadecylem modifikovaným SiO₂ jakožto stacionární fází (C18, Nucleosil 125 x 3 mm / 5 μ m). Podobnou HPLC metodu s fluorescenční detekcí navrhli Schempp a kol. [63]. Metoda sloužila ke kvantifikaci hypericinu v lidském séru a aplikovala

isokratickou reverzní eluci (MF: 23 % ethylacetátu, 60 % MeOH, 27 % pufované vody (pH = 2)) na koloně C18 Kromasil 100 x 4 mm / 5µm. Obě tyto metody HPLC využívají před analýzou extrakci typu kapalina-kapalina (LLE) za účelem čištění a koncentrace vzorků rostlinných extraktů.

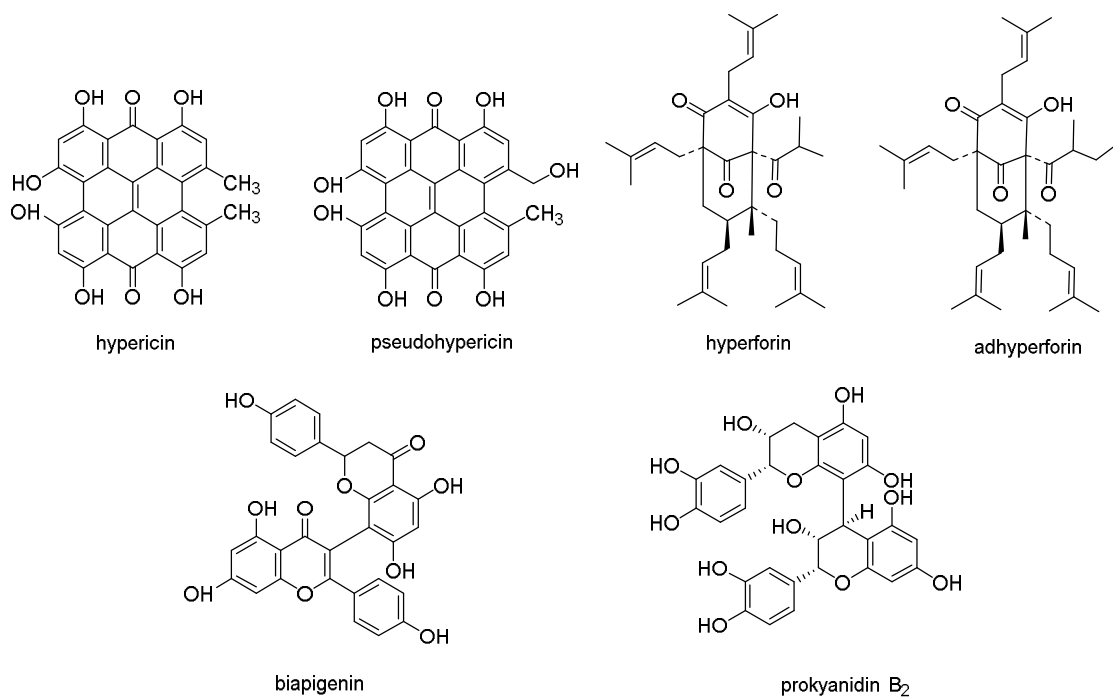
Obecně lze říci, že většina publikovaných HPLC metod pro stanovení látek obsažených v třezalce tečkované využívá eluci v reverzním režimu při kyselém pH s vysokým podílem organické fáze a stacionární fáze na bázi C18. Vzhledem k používanému isokratickému režimu tyto metody zpravidla poskytují píky s relativně velkou šířkou v polovině výšky a vedou k nízké citlivosti analytické metody.

Vedle klasických chromatografických kolon byla popsána také HPLC analýza hlavních složek třezalky tečkované na stacionární fázi Luna fenyl-hexyl za použití isokratické a gradientové eluce v kyselém reverzním režimu [64]. Stamenković a kol. [65, 66] popsali také metodu preparativní HPLC analýzy pro získání hlavních složek třezalky tečkované isokratickou elucí ve slabě kyselém reverzním režimu na koloně Zorbax Eclipse XDB C18. Nuevas-paz a kol. [66] vyvinuli mírně odlišnou HPLC metodu s využitím gradientové eluce v reverzním režimu na koloně LiChrospher 100 C18.

Přestože byla v odborné literatuře [54-66] popsána celá řada HPLC metod pro analýzu složek třezalky tečkované, použití stacionárních fází s pentafluorfenylovou skupinou (PFP) pro analýzu polyfenolů z této rostliny podle mého průzkumu zatím publikováno nebylo.

1.4.3 Chemické struktury vybraných látek v třezalce tečkované

Třezalka tečkovaná obsahuje několik účinných látek, a to flavonoidy (především hypericin, rutosid, hyperosid), třísloviny, pektin, cholin, saponiny a xantony [67]. Nejvýznamnější sloučeniny obsažené v třezalce tečkované a jejich chemické struktury jsou znázorněny na Obr. 12. Jedná se ve většině případů o polyaromatické látky s větším počtem fenolických skupin (tj. hypericin, pseudohypericin, biapigenin a prokyanidin B₂) či enolickou skupinou (tj. hyperforin a adhyperforin). Hyperforin a adhyperforin jsou degradační produkty těchto polyfenolů [68]. O fyzikálně-chemických vlastnostech těchto látek bude pojednáno v následující podkapitole.



Obr. 12: Chemické struktury vybraných látek, které jsou obsaženy v třezalce tečkované [69].

1.4.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných látek z třezalky tečkované

Pro vývoj HPLC metodiky je velmi důležité znát fyzikálně-chemické vlastnosti separovaných látek. Jedná se především o takové molekulární deskriptory, jako je lipofilita a indexy acidobazických vlastností (např. záporný dekadický logaritmus disociační konstanty pK_A). Z mnoha studií o HPLC je známo, že mezi lipofilitou analytů danou dekadickým logaritmem rozdělovacího koeficientu v systému *n*-oktanol – voda (tj. $\log P$) a retenčním faktorem získaným na stacionární fázi C18 v reverzním elučním módu je úměrný vztah. Čím je tedy lipofilita látky vyšší, tím vyšší retenci na C18 fázi lze očekávat. Podobná logika platí také pro využití znalosti o pK_A . Pokud se analyt z velké části vyskytuje v daném prostředí jako neionizovaná molekula, je jeho lipofilita vyšší než v případě příslušného iontu. Pro potřeby návrhu analytické metody byly tedy v programu MarvinSketch 14.9.8.0 vypočítány hodnoty $\text{Clog } P$ (tj. vypočítané $\log P$), $\text{Cp}K_A$ (tj. vypočítané pK_A) a dekadický logaritmus distribučního koeficientu v systému *n*-oktanol – voda při $\text{pH} = 7,4$ (tj. $\text{Clog } D_{7,4}$).

Protože látky obsažené v třezalce tečkované jsou tvořeny většinou polyfenolickými látkami, které mají mírně kyselý charakter, bylo navrženo, že pro jejich identifikaci bude během vypracování bakalářské práce použita vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie pracující v negativním módu (tj. monitorující zastoupení aniontů v eluátu). Hodnoty poměrů přesných hmotností iontů po odtržení jednoho protonu (tj. vodíkového kationtu z jedné fenolické skupiny) a formálního náboje (tj. m/z $[M-H]^-$), vypočítané $\text{Cp}K_A$ (v případě více funkčních látek se jedná o hodnotu spojenou s prvním stupněm disociace – 1°), $\text{Clog } P$ a $\text{Clog } D_{7,4}$ jsou uvedeny v Tab. 3.

Název látky	m/z [M-H] ⁻	pK_A (1°)	CLog P	Log $D_{7,4}$
Hypericin	503,07724	6,65	7,70	6,41
Pseudohypericin	519,44155	6,04	6,42	4,40
Hyperforin	535,37928	8,50	9,67	6,41
Adhyperforin	549,39493	8,50	10,11	6,86
Biapigenin	539,09837	6,41	5,24	3,75
Prokyanidin B ₂	577,13515	8,69	3,12	3,09

Tab. 3: Přehled fyzikálně-chemických vlastností látek v třezalce tečkované.

Z přehledu v Tab. 3. lze vyvodit, že všechny vybrané látky mají poměrně vysokou lipofilitu a budou se na reverzní stacionární fázi C18 poměrně dobře zadržovat. Dle Clog P lze nejvyšší retenci předpokládat u adhyperforinu, nejnižší pak u prokyanidinu B₂. V případě mírně bazického prostředí (tj. pH = 7,4) však dochází k ionizaci těchto látek a lipofilita se v některých případech výrazně snižuje. Jak ukazuje vypočítané Clog $D_{7,4}$, nejvýznamnější pokles retence lze při použití mobilní fáze s pH = 7,4 očekávat u hyperforinu, minimální u prokyanidinu B₂. Zajímavé též je, že Clog $D_{7,4}$ dosahuje v případě hypericinu a hyperforinu stejných hodnot. Analogické změny lipofility lze očekávat, pokud by se použilo vodné prostředí s vyšším pH. V kyselém prostředí by se naopak hodnoty Clog $D_{7,4}$ blížily hodnotám Clog P , protože by došlo potlačování disociace fenolických skupin, respektive enolické skupiny v případě hyperforinu a adhyperforinu.

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout analytickou HPLC metodu pro stanovení hypericinu v částech třezalky tečkované. Jelikož hypericin ve své molekulární struktuře obsahuje několik benzenových jader, byla navržena pracovní hypotéza, že chromatografická kolona se stacionární fází modifikovanou PFP skupinou přinese výhodnější separační vlastnosti než klasická reverzní stacionární fáze modifikovaná lineárními oktadecylovými řetězci C18.

Dílčí cíle bakalářské práce lze vyjádřit následujícím přehledem elementárních úkolů:

- Popsat základní principy HPLC
- Charakterizovat třezalku tečkovanou, hypericin a jeho vlastnosti
- Určit chromatografické vlastnosti standardu hypericinu pomocí HPLC na stacionární fázi typu C18 a PFP
- Prostudovat vliv složení mobilní fáze, typu gradientu a elučních módů (tj. normální, polárně organický a reverzní) na retenci hypericinu na stacionární fázi typu C18 a PFP
- Optimalizovat HPLC metodu pro stanovení hypericinu v methanolových extraktech z různých částí třezalky tečkované na stacionární fázi typu C18 a PFP
- Kvantifikovat množství hypericinu v rostlinných částech třezalky tečkované
- Ověřit kvalitu separace hypericinu na stacionární fázi typu C18 a PFP pomocí vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (HRMS)
- Interpretovat výsledky získané v HPLC analýzách

Navržené dílčí cíle bakalářské práce představují vstup do problematiky analýzy polyfenolických látek v třezalce tečkované s využitím stacionární fáze s PFP skupinou. Vzhledem k náročnosti vývoje optimální gradientové HPLC metody pro stanovení hypericinu na studovaných stacionárních fázích nebylo cílem bakalářské práce finální analytickou metodu validovat.

3 Experimentální část

3.1 Použité přístroje, programy a pomůcky

K provedení analýz v rámci této bakalářské práce byl použit kapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 (ThermoFisher Scientific, vyrobeno v Německu). Tento kapalinový chromatograf je sestaven z několika částí:

- Binární vysokotlaké čerpadlo HPG-3400RS spojené s vakuovým odplyňovačem
- Kolonový termostat TCC-3000
- Automatický dávkovač WTS-3000 s šesticestným ventilem a nástřikovou smyčkou o objemu 25 μ l
- Čtyř kanálový UV detektor VWD-3000

Pro detekci separovaných látek byl použit také hmotnostní spektrometr Q Exactive Plus (ThermoFisher Scientific, vyrobeno v Německu) s následujícím iontovým zdrojem a generátorem nosného plynu:

- Ionizační elektrosprej HESI (Heated ElectroSpray Ionization)
- Generátor dusíku Peak Scientific Genius 1022

Pro výpočty a zpracování dat byl použit následující software:

- MarvinSketch 14.9.8.0 pro výpočet molekulárních deskriptorů
- Chromeleon 6.80 SR13 pro zpracování UV-VIS spekter
- Program Xcalibur 3.0.63 pro zpracování hmotnostních spekter
- Program Microsoft Excel 2013 pro statistické výpočty

Při přípravě vzorků a mobilních fází byly použity následující přístroje a pomůcky:

- Analytické váhy Sartorius CPA225D-0CE
- Pipety Eppendorf® Reference (0,5 - 10 μ l, 10 - 100 μ l, 100 - 1 000 μ l)
- Ultrazvuková lázeň Elma S 40
- Ph-metr Schott Lab 850 s elektrodou SenTix 81
- Laboratorní sklo
- Lednice
- Špičky Eppendorf®
- Polypropylenové mikrozkušavky Eppendorf® (V = 2 ml)
- Skleněné vialky (Fisher Scientific, ND9, V = 1,5 ml) s polypropylenovým víčkem a silikon-PTFE septem

Ultra čistá voda (typ ASTM I, 18,2 M Ω .cm při 25 °C) pro přípravu vodných fází byla získána přístrojem:

- Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF (ThermoFisher Scientific, vyrobeno v Německu).

Pro odstředění heterogenních směsí byla použita tato odstředivka:

- Universal 320 R, Hettich Zentrifugen, Schoeler Instruments, Německo.

Pro extrakci rostlinných vzorků třezalky tečkované byl použit tento mechanický rotátor:

- Rotátor Multi Bio RS – 24, Biosan, Litva.

Pro ultrafiltraci rostlinných extraktů byly použity tyto centrifugační mikrofiltry:

- Microcon Milipore, Ultracel YM-10, USA.

3.2 Použité chromatografické kolony

Pro HPLC analýzy v rámci této bakalářské práce byly použity dvě kolony:

- Kinetex C18, 150 x 3 mm / 2,6 μm , 100 \AA
- Kinetex PFP, 150 x 4,6 mm / 5 μm , 100 \AA

Ochrana chromatografické kolony před případným poškozením mechanickými částicemi ve vzorcích či mobilní fázi byla zajištěna předřazením in-line filtru (Vici Jour) s kovovou fritou o porozitě 0,5 μm .

3.3 Použité chemikálie

Při práci v laboratoři jsem používala tato rozpouštědla a aditiva: acetonitril, hexan, methanol, kyselina octová, kyselina mravenčí, triethylamin a kyselina citrónová trihydrát. Všechna použitá rozpouštědla a aditiva byla zakoupena u firmy Sigma Aldrich se stupněm čistoty LC-MS nebo HPLC.

K přípravě kalibračních vzorků hypericinu byl použit analytický standard hypericinu (no.: BP-BP0752, 95 % HPLC-UV), zakoupený od španělské firmy Cymit Quimica S.L.

Hmotnostní spektrometr byl kalibrován pomocí kalibrantů Pierce® LTQ Velos ESI (ThermoFisher Scientific).

3.4 Příprava vzorků třezalky tečkované

Deset vzorků celých rostlin třezalky tečkované byly nasbírány v lokalitě Třeboň v České republice, ručně vyčištěny a vysušeny po dobu 14 dní při pokojové teplotě v temné místnosti. Listy, květy, nať, a kořeny byly odděleny a mechanicky homogenizovány na prášek pomocí třecí misky s tloučkem. 250 mg prášku každé bylinné části bylo smícháno s 25 ml methanolu v polypropylenových zkumavkách a extrahováno po dobu 6 hodin v automatickém rotátoru (250 rpm) při laboratorní teplotě (tj. cca 25 °C). Dále byly vzorky 60 minut sonifikovány v ultrazvukové lázni a následně odstředovány (14000 rpm) po dobu 20 minut při teplotě 20 °C. Supernatant byl následně separován, přefiltrován přes ultrafiltr Ultracel YM-10 a použit pro chromatografické analýzy. Výběr methanolu jako optimálního

extrakčního činidla pro hypericin byl proveden na základě rozboru odborné literatury [62]. Podle publikovaných experimentálních dat je methanol nejlepším extrakčním činidlem pro hypericin a hyperforin ve srovnání s ethylacetátem, dichlormethanem, chloroformem a diethyletherem.

3.5 Vývoj analytické metody pro stanovení hypericinu

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat účinnost stacionární fáze s PFP skupinou (Kinetex PFP, 150 x 4,6 mm / 5 µm, 100 Å) oproti klasické C18 stacionární fázi (Kinetex C18, 150 x 3 mm / 2,6 µm, 100 Å) při HPLC separaci hypericinu od ostatních látek přítomných v methanolových extraktech z vysušených a homogenizovaných částí třezalky tečkované. Byl tedy zvolen přístup, kdy se hledala optimální HPLC metoda pro stanovení hypericinu pomocí screeningu různých mobilních fází. Postup vývoje analytické HPLC metody lze charakterizovat těmito kroky, rozdělenými do dvou oddílů:

1. Příprava standardního roztoku hypericinu v MeOH o koncentraci 25 µg/ml
 2. HPLC analýza standardního roztoku hypericinu na chromatografických kolonách typu PFP a C18 v normálním módu
 3. HPLC analýza standardního roztoku hypericinu na chromatografických kolonách typu PFP a C18 v polárně organickém módu
 4. HPLC analýza standardního roztoku hypericinu na chromatografických kolonách typu PFP a C18 v reverzním módu
 5. Separace hypericinu z methanolového extraktu nati třezalky tečkované nejvýhodnější HPLC metodou na kolonách typu PFP a C18
 6. Optimalizace nejvýhodnější HPLC metody pro stanovení hypericinu na chromatografických kolonách typu PFP a C18
-
1. Sběr, vysušení a homogenizace třezalky tečkované
 2. Extrakce rostlinných částí třezalky tečkované methanolem
 3. Analýza methanolových extraktů třezalky tečkované optimální HPLC metodou a ověření identity hypericinu pomocí HRMS

Smyslem uvedeného postupu bylo nejprve nalézt vhodnou HPLC metodu, při které se pík hypericinu vymývá z chromatografického systému v retenčním čase přibližně uprostřed analýzy a má další vyhovující chromatografické charakteristiky, jako je šířka v polovině výšky a asymetrie. Protože cílem bylo porovnat vlastnosti stacionární fáze typu C18 a PFP, byly analogické HPLC metody aplikovány na obou kolonách a výsledné chromatografické vlastnosti hypericinu srovnány.

HPLC metoda, která vedla k optimální retenci standardu hypericinu na obou chromatografických kolonách, byla následně ověřena analýzou methanolového extraktu z nati třezalky tečkované.

Vybraná HPLC metoda byla nakonec optimalizována pro nejlepší separaci hypericinu od látek přítomných v methanolových extraktech třezalky tečkované a

použita ke kvantifikaci. Finální evaluace kvality separace hypericinu byla provedena pomocí HRMS.

3.5.1 Přístrojové nastavení

Pro analýzy byly použity přístroje: analytický UHPLC systém Dionex UltiMate 3000 spolu s Q Exactive Plus hybridním kvadrupólem-orbitrap spektrometr. Nastavení HPLC systému pro analýzy na chromatografických kolonách Kinetex PFP 150 x 4,6 mm / 5 µm, 100 Å a Kinetex C18 150 x 3 mm / 2,6 µm, 100 Å je popsáno v Tab. 4.

Stacionární fáze	Kinetex PFP	Kinetex C18
Průtok MF [ml/min]	1,0	0,4
Teplota kolonového termostatu [°C]	27	27
Teplota v autosampleru [°C]	10	10
Vlnové délky použité při UV-VIS detekci [nm]	210, 254, 278, 290	210, 254, 278, 290
Nástřikový objem [µl]	5	5

Tab. 4: Přehled nastavení HPLC systému pro analýzy na vybraných kolonách.

Pokud jde o UV-VIS detekci, byl proveden průzkum, při kterých vlnových délkách dochází k nejcitlivější detekci hypericinu. Vlnové délky byly voleny v UV a VIS části spektra. Absorpčního maxima hypericinu v methanolovém roztoku je dle odborné literatury [68] dosaženo při vlnové délce 588 nm, avšak ověřováním absorbance při různých vlnových délkách během HPLC analýzy bylo maximálních hodnot dosaženo často při vlnové délce 210 nm. Kvůli obměnám mobilních fází (tj. jejich složení, pH, iontové síly) během analýz, byla nakonec pro monitoring zvolena kompromisní vlnová délka 278 nm, při které byl pík hypericinu detekován s uspokojivou citlivostí ve všech použitých HPLC metodách. Chromatogramy detekované při ostatních vlnových délkách měly pomocný význam.

Mrtvý retenční čas systému byl stanoven na základě analýzy vodného roztoku kyseliny citrónové ($c = 1 \text{ mg/ml}$), která byla provedena 3x (metoda č. 9, uvedená v Tab. 5). Průměrné hodnoty mrtvých retenčních časů ve všech analýzách polárně organického elučního režimu i reverzního elučního režimu se neměnily: $t_0(\text{Kinetex C18}) = 1,31 \text{ min}$, $t_0(\text{Kinetex PFP}) = 1,30 \text{ min}$.

Nastavení hmotnostního spektrometru pro identifikaci hypericinu bylo pro případ analýz na koloně Kinetex C18 provedeno následujícím způsobem: průtok stínícího plynu (sheath gas) – 50, průtok pomocného plynu (auxiliary gas) – 13, průtok rozptylového plynu (sweep gas) – 3, napětí sprejovací kapiláry v negativním módu – 3,5 kV, teplota kapiláry – 300 °C, teplota pomocného plynu (auxiliary gas) – 300 °C, nastavení S-lens – 50, počet mikroscanů – 1, maximální nástřikový čas – 200 ms, kontrola automatického zisku, tzv. automatic gain control (AGC) – $3e6$, rozlišení – 70 000, normalizovaná kolizní energie NCE – 50.

V případě HPLC analýz s kolonou Kinetex PFP byly použity stejné hodnoty nastavení MS, až na teplotu kapiláry a pomocného plynu. Kvůli vyššímu průtoku mobilní fáze byla nastavena teplota kapiláry a nosného plynu na 450 °C.

HRMS analýzy byly provedeny v kombinovaném režimu full-scanu (FS) a celkové iontové fragmentace (AIF) v rozsahu m/z 150 – 1 500 a 80 – 1 200.

3.5.2 HPLC analýza standardního roztoku hypericinu na chromatografických kolonách typu PFP a C18 v normálním módu

Při vývoji optimální HPLC metody v nepolárním (normálním) módu na kolonách Kinetex PFP a Kinetex C18 bylo použito mobilní fáze složené ze 100 % hexanu. Nejprve byla MF vložena na 5 minut do ultrazvukové lázně a poté zavedena do HPLC systému. HPLC systém byl následně ekvilibrován po 20 minut a připraven k analýze. Mezitím byl ze vzorku pevného standardu hypericinu připraven methanolvý roztok o koncentraci 25 µg/ml. Samotná analýza probíhala 10 minut, a to isokratickou elucí.

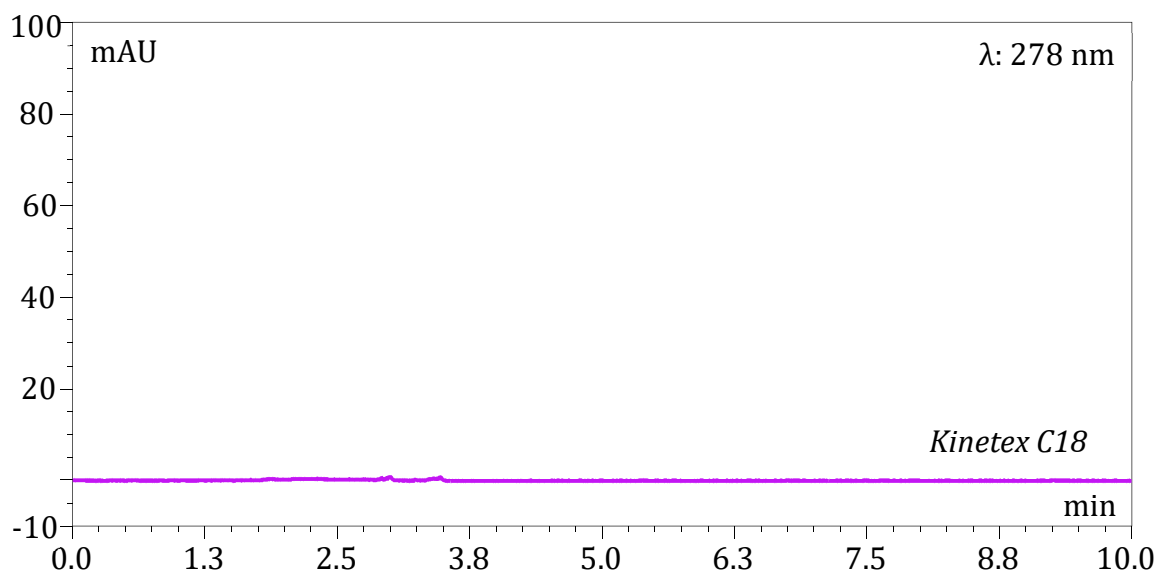
Základní parametry HPLC metodik již byly uvedeny v Tab. 4. Připomeňme, že nastavení HPLC metody pro analýzu na koloně Kinetex C18 bylo nepatrně upraveno takto: nástřikový objem byl 5 µl, průtok MF byl 0,4 ml/min, teplota kolonového termostatu byla 27 °C a teplota autosampleru byla 10 °C. Záznam chromatogramu byl proveden pomocí UV-VIS detektoru, pracujícím na 4 vlnových délkách: 210, 254, 278 a 290 nm.

Nastavení HPLC systému pro analýzu s kolonou Kinetex PFP bylo následující: nástřikový objem byl 5 µl, průtok MF byl 1 ml/min, teplota kolonového termostatu byla 27 °C a teplota autosampleru byla 10 °C.

Získané chromatogramy na kolonách Kinetex C18 a Kinetex PFP jsou uvedené na Obr. 13 a Obr. 14.

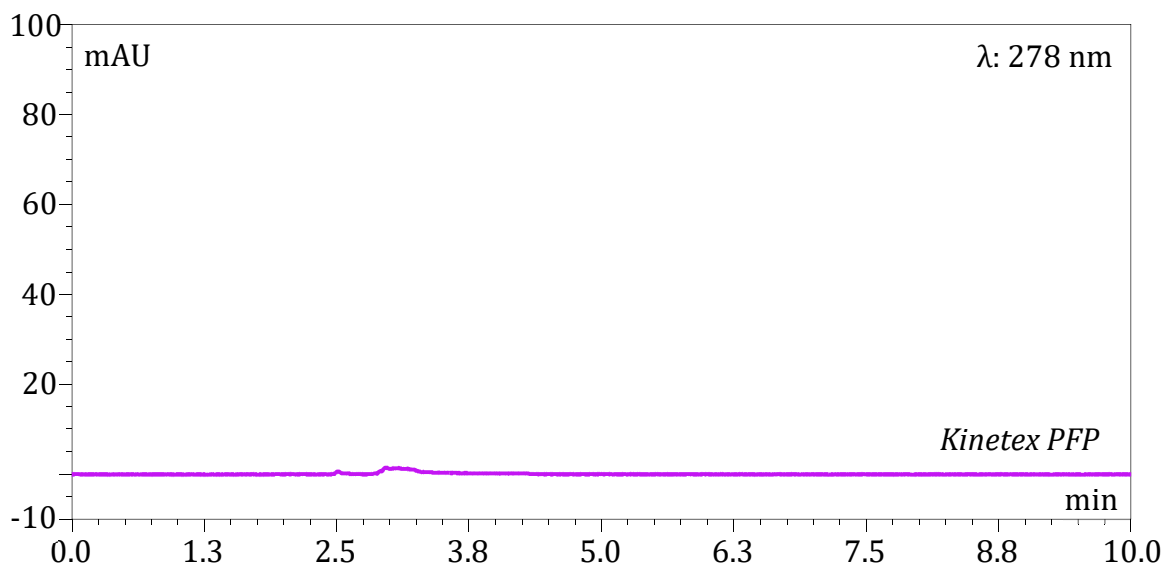
V normálním módu pomocí isokratické eluce 100 % hexanem na koloně Kinetex C18 se neobjevil žádný pík (Obr. 13), a to z toho důvodu, že mobilní fáze není schopna při tomto složení hypericin ze stacionární fáze vymýt během 10 minutové analýzy. Dochází tedy k relativně silné retenci hypericinu.

Vedle této analýzy byly provedeny i další experimenty, kdy bylo do mobilní fáze přidáno malé množství propan-2-olu, tj. 5 % (v/v), avšak výsledky nebyly uspokojivé, protože nedošlo k podstatnému snížení retenčního času analytu.



Obr. 13: Chromatogram isokratické HPLC analýzy vzorku hypericinu ($c = 25 \mu\text{g/ml}$ v MeOH) v normálním módu (MF = hexan) na koloně Kinetex C18 150 x 3 mm / 2,6 μm , 100 Å.

Během další analýzy o délce 10 minut v normálním módu pomocí isokratické eluce a 100 % hexanu jako mobilní fáze na koloně Kinetex PFP se neobjevil taktéž žádný pík (Obr. 14). Tato skutečnost je způsobena tím, že mobilní fáze není schopna při takovémto složení hypericin ze stacionární fáze Kinetex PFP vymýt, protože i v tomto případě s ní velmi silně interaguje.

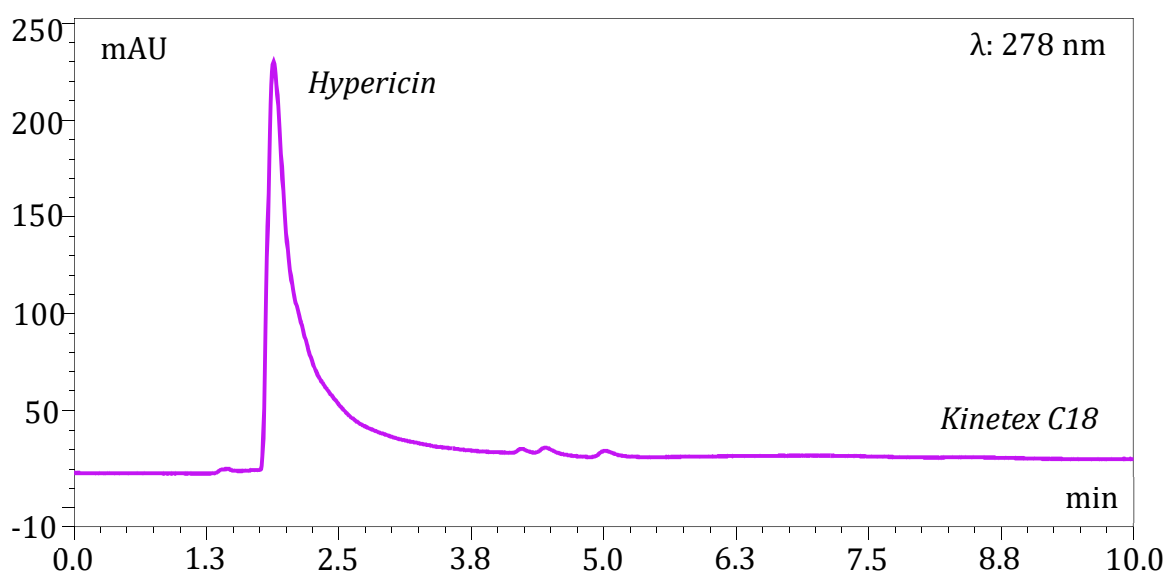


Obr. 14: Chromatogram isokratické HPLC analýzy vzorku hypericinu ($c = 25 \mu\text{g/ml}$ v MeOH) v normálním módu (MF = hexan) na koloně Kinetex PFP 150 x 4,6 mm / 5 μm , 100 Å.

3.5.3 HPLC analýza standardního roztoku hypericinu na chromatografických kolonách typu PFP a C18 v polárně organickém módu

Vzorek standardu hypericinu v methanolu ($c = 25 \mu\text{g/ml}$) byl také analyzován isokratickou HPLC metodou s využitím methanolu jako mobilní fáze. Nastavení HPLC systému bylo analogické, jako v případě aplikace normálního elučního módu popsaného v kapitole 3.5.2 výše.

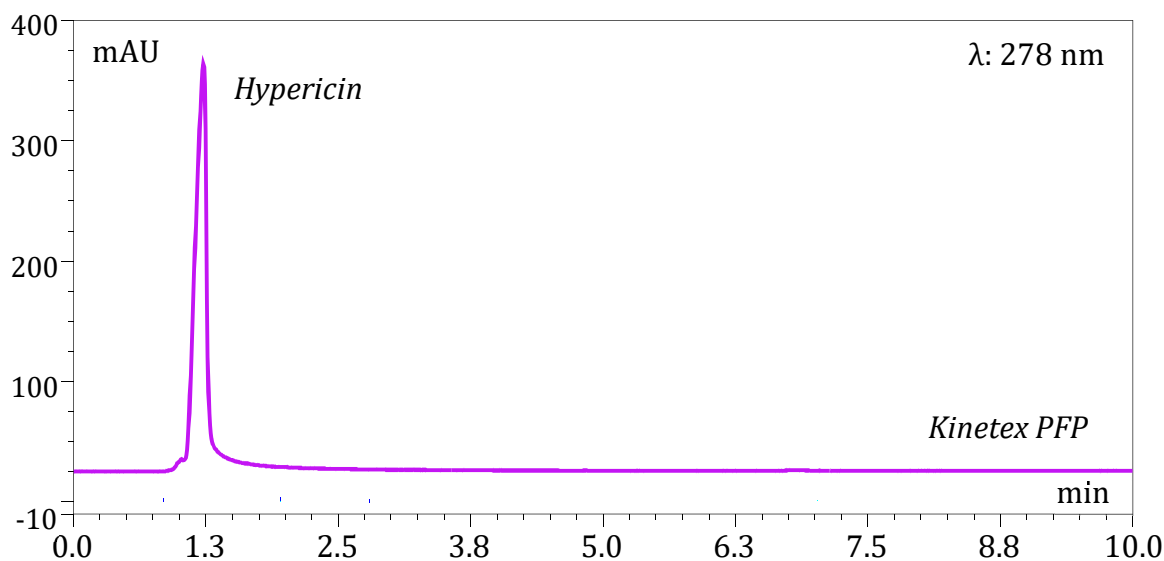
V polárně organickém módu (Obr. 15) na koloně Kinetex C18 pomocí isokratické eluce a 100 % methanolu jako mobilní fáze byl pík hypericinu vymyt téměř v mrtvém retenčním čase ($k = 0,44$, $R_t = 1,88$ minuty). Pík není symetrický, dochází u něho ke chvostování neboli tailingu ($c = 25 \mu\text{g/ml}$, $w_{0,5} = 0,22$, $A = 9,6$).



Obr. 15: Chromatogram isokratické HPLC analýzy vzorku hypericinu ($c = 25 \mu\text{g/ml}$ v MeOH) v polárně organickém módu (MF = methanol) na koloně Kinetex C18 150 x 3 mm / 2,6 μm , 100 Å.

Podobně byl stejnou isokratickou HPLC metodou hypericin velmi rychle vymyt i z kolony Kinetex PFP (Obr. 16). Retenční čas hypericinu při použití 100 % MeOH jako mobilní fáze činil 1,31 minuty. Pík je poměrně symetrický, dochází u něho k nepatrnému hrnutí neboli frontování, nicméně je podstatně štíhlejší a užší než pík v případě chromatografické analýzy s isokratickou elucí vzorku hypericinu ($c = 25 \mu\text{g/ml}$ v MeOH, $w_{0,5} = 0,12$, $A = 0,92$) na koloně Kinetex C18.

Pokud bylo k MeOH přidáno 0,1 % FA, nedošlo ani na jedné z použitých chromatografických kolon k výraznému zvýšení retence hypericinu. Podobný, a tudíž z chromatografického pohledu nepřínosný, účinek mělo přidání 0,1 % TEA. Ve všech případech byl hypericin vymyt ze stacionární fáze prakticky v mrtvém retenčním čase.



Obr. 16: Chromatogram isokratické HPLC analýzy vzorku hypericinu ($c = 25 \mu\text{g/ml}$ v MeOH) v polárně organickém módu (MF = methanol) na koloně Kinetex PFP 150 x 4,6 mm / 5 μm , 100 Å.

3.5.4 HPLC analýza standardního roztoku hypericinu na chromatografických kolonách typu PFP a C18 v reverzním módu

Jelikož metody založené na normálním a polárně organickém elučním módu neposkytly vhodné výsledky ve smyslu přijatelné retence hypericinu pod 10 min a píků s nízkými hodnotami $w_{0,5}$ a A, bylo značné úsilí věnováno průzkumu HPLC metod pracujících v reverzním elučním módu. Dle literatury mají reverzní režimy v HPLC analýzách hypericinu v různých matricích nejčastější použití [54-62]. V této bakalářské práci byly zkoumány především účinky pH a aditiv v mobilní fázi na retenci hypericinu na kolonách Kinetex C18 a Kinetex PFP. Jako primární složky MF byly zvoleny kombinace těchto rozpouštědel: H₂O – ACN, H₂O – MeOH. Analytické HPLC metody pracovaly většinou s lineárním gradientem, který je charakterizován Schématem 1.

Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	15	85
1	15	85
5.5	0	100
8	0	100
8	15	85
10	15	85

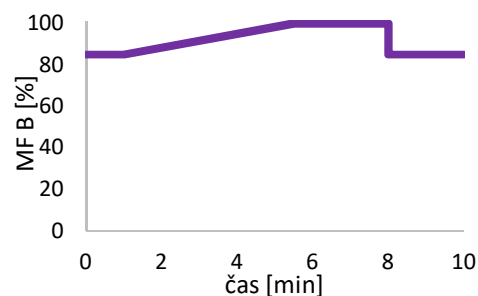


Schéma 1: Program gradientové eluce v reverzním módu.

Gradientový profil ve Schématu 1 byl obměňován, především pokud jde o startovní a konečnou koncentraci MF A a MF B. Časový průběh gradientu byl v základu ponechán ve všech zkoumaných analytických HPLC metodách.

Celkem bylo provedeno několik desítek různých screeningových analýz s odlišnými MF a nastavením gradientu. Ukázalo se, že retence hypericinu v reverzním režimu je jak na koloně Kinetex C18, tak na koloně Kinetex PFP velmi silná a k dosažení eluce během 10 minut chromatografické analýzy je nutné začít analýzu při vysokém podílu organické složky (tj. MF B > ~ 60 % (v/v), ACN nebo MeOH). Běžné HPLC metody začínající např. s 10 % organické složky, jejíž koncentrace v průběhu 10 minut metody lineárně vzroste na 100 % a navrátí se zpět na 10 %, nedokážou hypericin vymýt ze zvolených chromatografických kolon.

V Tab. 5 je tedy uveden pouze přehled klíčových metod, které vedly k nalezení optimální gradientové HPLC metody pro separaci hypericinu na kolonách Kinetex C18 a Kinetex PFP.

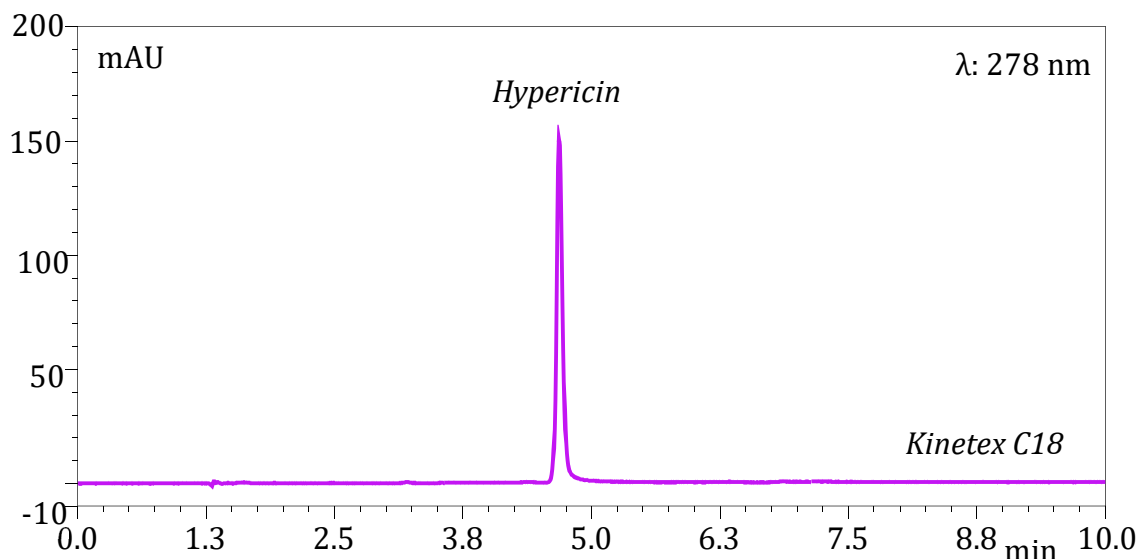
Č.	Mobilní fáze		Interval MF B [%]	Kinetex C18 / Kinetex PFP		
	MF A	MF B		k	R _t [min]	w _{0,5} [min]
1.	H ₂ O	ACN	50 - 100	1,70/2,96	3,54/5,15	0,14/0,17
2.	H ₂ O + 0,1 % FA + 0,1 % TEA	ACN + 0,1 % FA + 0,1 % TEA	85 - 100	1,34/2,55	3,07/4,61	0,11/0,08
3.	H ₂ O + 0,12 % FA + 0,08 % TEA	ACN + 0,12 % FA + 0,08 % TEA	85 - 100	3,92/4,99	6,45/7,79	0,70/0,12
4.	H ₂ O + 0,1 % FA + 0,2 % TEA	ACN + 0,1 % FA + 0,2 % TEA	85 - 100	2,87/3,82	5,07/6,27	0,15/0,17
5.	H ₂ O + 0,1 % FA + 0,1 % TEA	MeOH + 0,1 % FA + 0,1 % TEA	85 - 100	5,13/6,08	8,03/9,20	0,22/0,12
6.	H ₂ O + 0,12 % FA + 0,08 % TEA	MeOH + 0,12 % FA + 0,08 % TEA	85 - 100	5,27/6,09	8,21/9,22	0,2/0,11
7.	H ₂ O + 0,1 % FA + 0,2 % TEA	MeOH + 0,1 % FA + 0,2 % TEA	85 - 100	2,87/3,82	5,07/6,27	0,15/0,17
8.	H ₂ O + 10 mM AA + 10 mM TEA	ACN	85 - 100	1,01/1,63	2,63/3,42	0,11/0,15
9.	H₂O + 100 mM AA + 100 mM TEA	ACN + 100 mM AA + 100 mM TEA	85 - 100	2,57/3,02	4,68/5,22	0,06/0,09

Tab. 5: Přehled provedených HPLC metod pro kolony Kinetex C18 a Kinetex PFP.

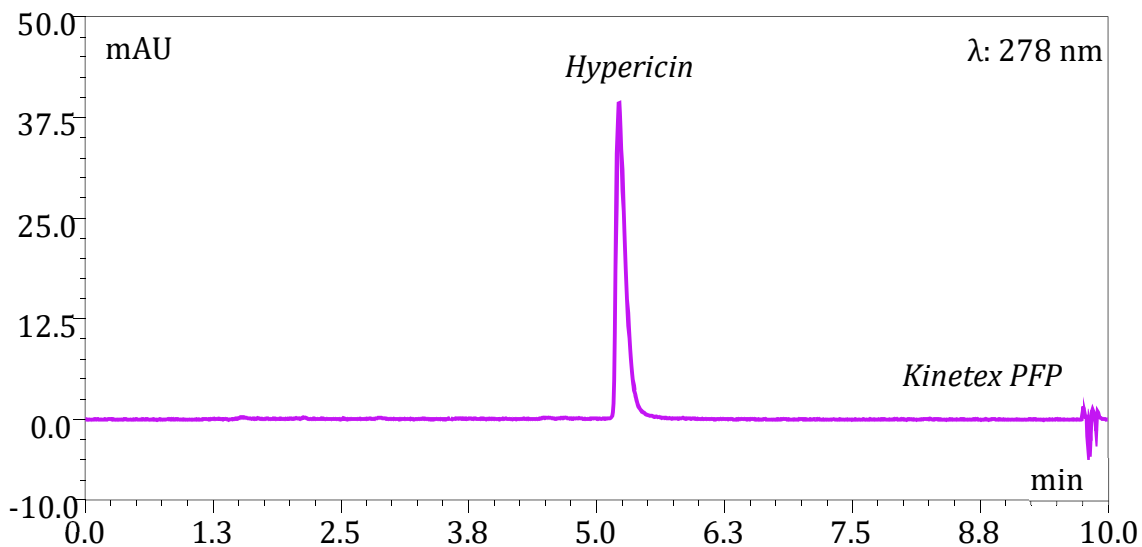
Z Tab. 5. vyplývá, že MeOH má nižší eluční sílu než ACN za jinak stejných chromatografických podmínek, a jeho použití v HPLC analýze vede k relativnímu zvýšení retenčního času hypericinu. Lze taktéž dobře pozorovat efekt aditiv (FA, AA, TEA), přidaných do MF, na retenci hypericinu.

Vyšší podíl kyselin v MF (tj. FA nebo AA) ve srovnání sází TEA vede k vyšší retenci hypericinu, naopak vyšší podíl báze retenci snižuje. Na retenci hypericinu má též významný vliv koncentrace aditiv, přičemž retence hypericinu roste, když je použita MF s vyšší iontovou silou.

Jelikož cílem bakalářské práce bylo vyvinout optimální HPLC metodu pro separaci hypericinu, byla pro další průzkum vybrána metoda, která využívala MF A: H₂O a MF B: ACN s přídávkem 100 mM AA a 100 mM TEA (metoda č. 9; Tab. 5). Pokud vezmeme v úvahu k , A , účinnost a $w_{0,5}$, vykazuje tato metoda optimální vlastnosti vzhledem ke všem studovaným variantám. Chromatogramy získané touto HPLC metodikou s využitím kolon Kinetex C18 a Kinetex PFP jsou uvedeny na Obr. 17 a Obr. 18.



Obr. 17: Chromatogram gradientové HPLC analýzy vzorku hypericinu ($c = 25 \mu\text{g/ml}$ v MeOH) v reverzním módu (MF A = H₂O + 100 mM FA + 100 mM TEA, MF B = ACN + 100 mM FA + 100 mM TEA, metoda č. 9) na koloně Kinetex C18 150 x 3 mm / 2,6 μm , 100 Å.



Obr. 18: Chromatogram gradientové HPLC analýzy vzorku hypericinu ($c = 25 \mu\text{g/ml}$ v MeOH) v reverzním módu (MF A = $\text{H}_2\text{O} + 100 \text{ mM FA} + 100 \text{ mM TEA}$, MF B = $\text{ACN} + 100 \text{ mM FA} + 100 \text{ mM TEA}$, metoda č. 9) na koloně Kinetex PFP $150 \times 4,6 \text{ mm} / 5 \mu\text{m}$, 100 \AA .

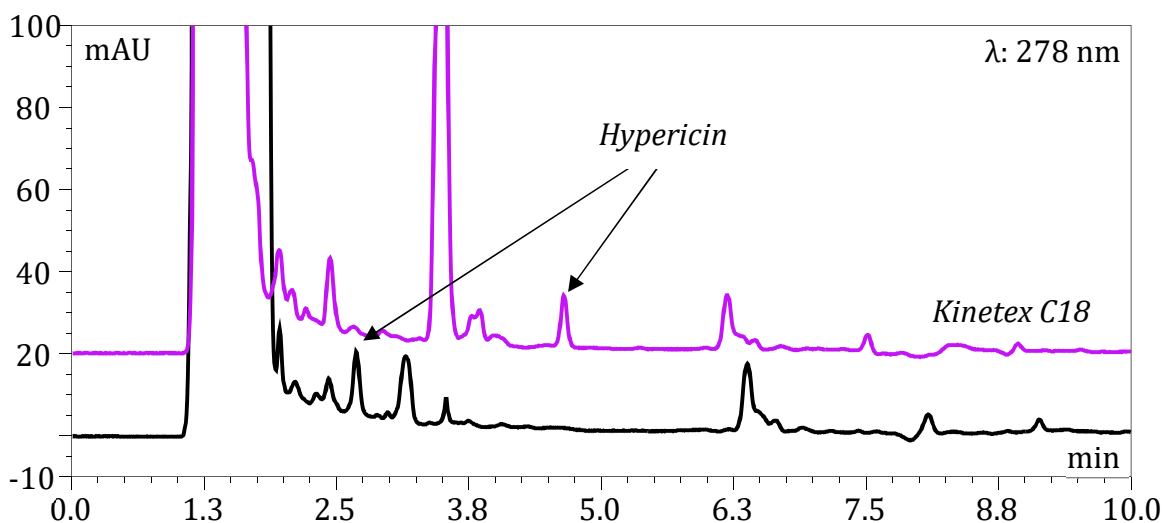
Chromatografické vlastnosti píku hypericinu získané HPLC metodou č. 9 jsou uvedeny v Tab. 6.

Kolona	k	R_t [min]	A	N	$w_{0,5}$ [min]
Kinetex C18	2,57	4,68	1,26	34902	0,06
Kinetex PFP	3,02	5,22	2,17	17052	0,09

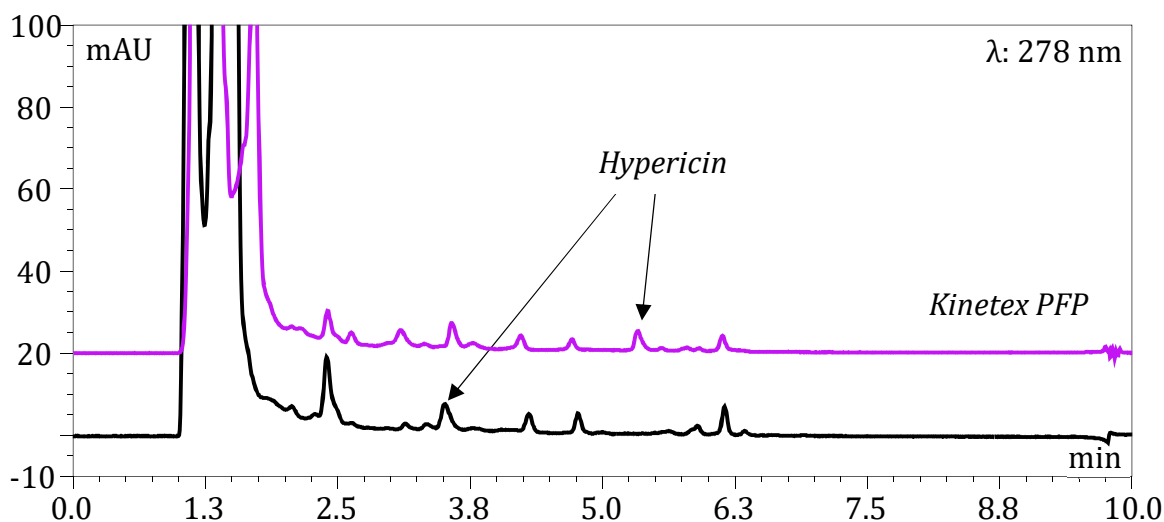
Tab. 6: Chromatografické vlastnosti hypericinu určené HPLC metodou č. 9 pro kolony Kinetex C18 a Kinetex PFP.

HPLC metody č. 8 a 9 (Tab. 5) byly dále zkoumány při analýze methanového extraktu z nati třezalky tečkované. Bylo zjištěno, že zvláště metoda č. 9 poskytuje pík hypericinu s uspokojivými chromatografickými vlastnostmi (tj. R_t přibližně v polovině průběhu lineárního gradientu, A píku nižší než 2, rozlišení zleva a zprava nižší než 2 a $w_{0,5}$ nižší než 0,2). Lepších výsledků nedosáhla žádná jiná HPLC metoda, která byla v rámci této bakalářské práce zkoumána. Srovnání HPLC analýz methanového extraktu nati třezalky tečkované provedených mobilní fází, která aplikovala 10 mM AA a 10 mM TEA (č. 8), a mobilní fází, která měla 10x vyšší koncentraci těchto aditiv, tj. 100 mM AA a 100 mM TEA (č. 9), je uvedeno na Obr. 19 a Obr. 20.

Bližší charakteristiky HPLC metody č. 9, vztažené k separaci hypericinu od ostatních látek přítomných v methanových extraktech z třezalky tečkované, jsou uvedeny v následující kapitole.



Obr. 19: Chromatogram gradientové HPLC analýzy methanolového extraktu nati třezalky tečkované metodou č. 8 (černá čára) a metodou č. 9 (fialová čára) na koloně Kinetex C18 150 x 3 mm / 2,6 μm , 100 Å.



Obr. 20: Chromatogram gradientové HPLC analýzy methanolového extraktu nati třezalky tečkované metodou č. 8 (černá čára) a metodou č. 9 (fialová čára) na koloně Kinetex PFP 150 x 4,6 mm / 5 μm , 100 Å.

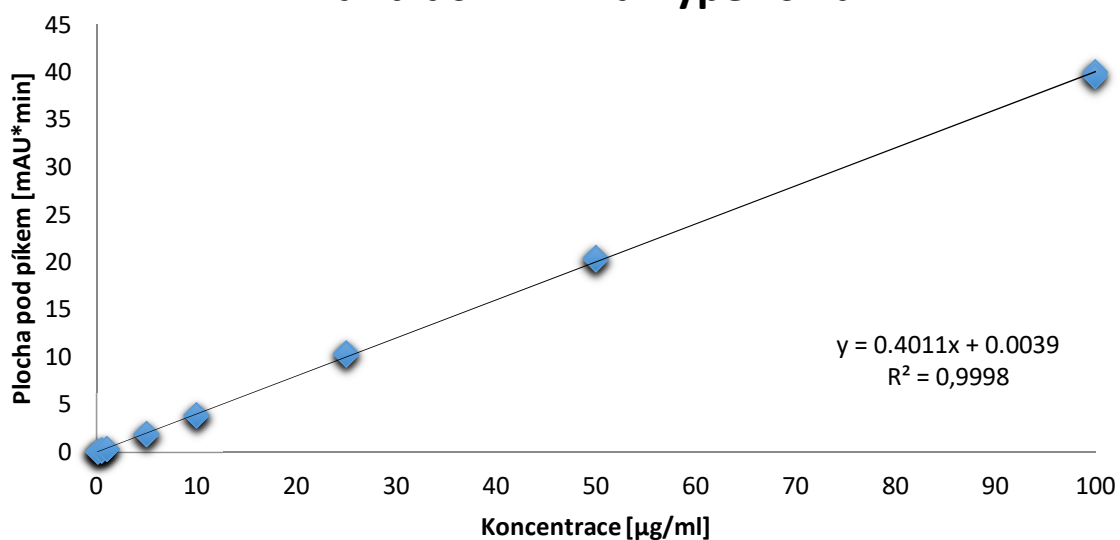
3.6 Stanovení hypericinu v částech třezalky tečkované

3.6.1 Kvantifikace hypericinu v částech třezalky tečkované s využitím HPLC a UV-VIS detekce

Pomocí HPLC metody č. 9 (více o ní v Tab. 5) byla v další etapě bakalářské práce provedena kvantifikace hypericinu v methanolových extraktech listu, květu, nati a kořene třezalky tečkované. Východiskem pro tuto kvantifikaci bylo stanovení kalibrační křivky pomocí osmi kalibračních standardů hypericinu v methanolu o

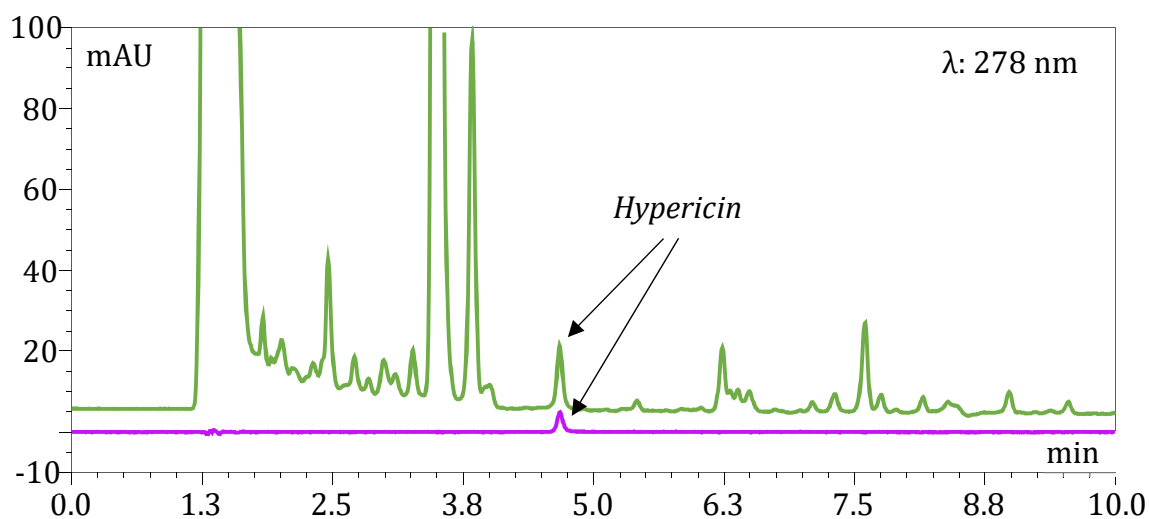
koncentraci: 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 a 100 µg/ml. Tyto koncentrační hladiny byly připraveny ředění zásobního roztoku hypericinu v methanolu o koncentraci 1 mg/ml. Každý vzorek kalibrační série byl analyzován 3x. Kalibrační křivka stanovená s využitím chromatografické kolony Kinetex C18 je uvedena na Obr. 21.

Kalibrační křivka hypericinu

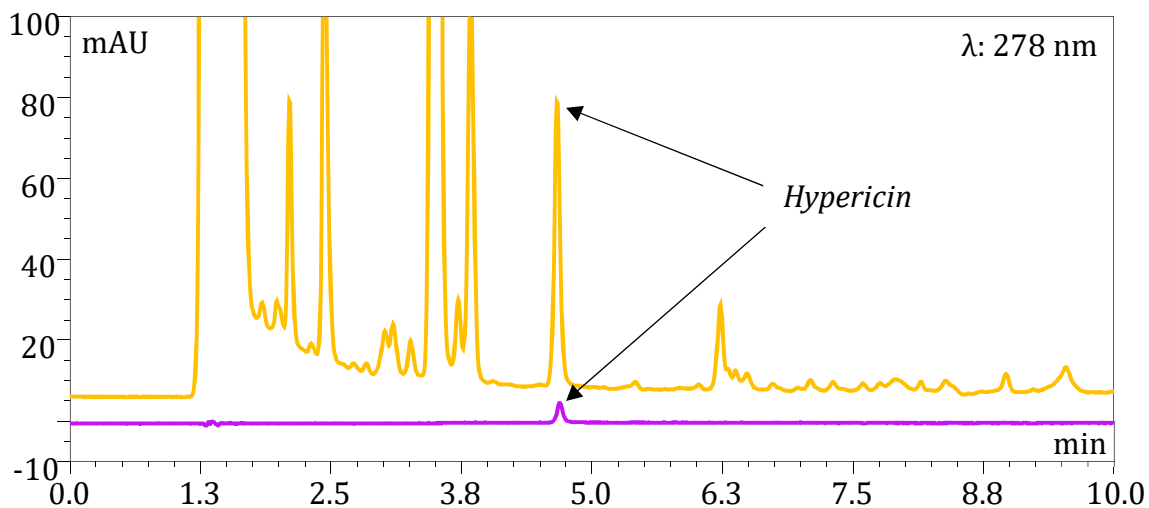


Obr. 21: Metoda externího standardu hypericinu ($c = 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50$ a 100 µg/ml). Graf ukazuje závislost plochy pod píkem stanoveného standardu hypericinu na připravených koncentracích standardu hypericinu na koloně Kinetex C18.

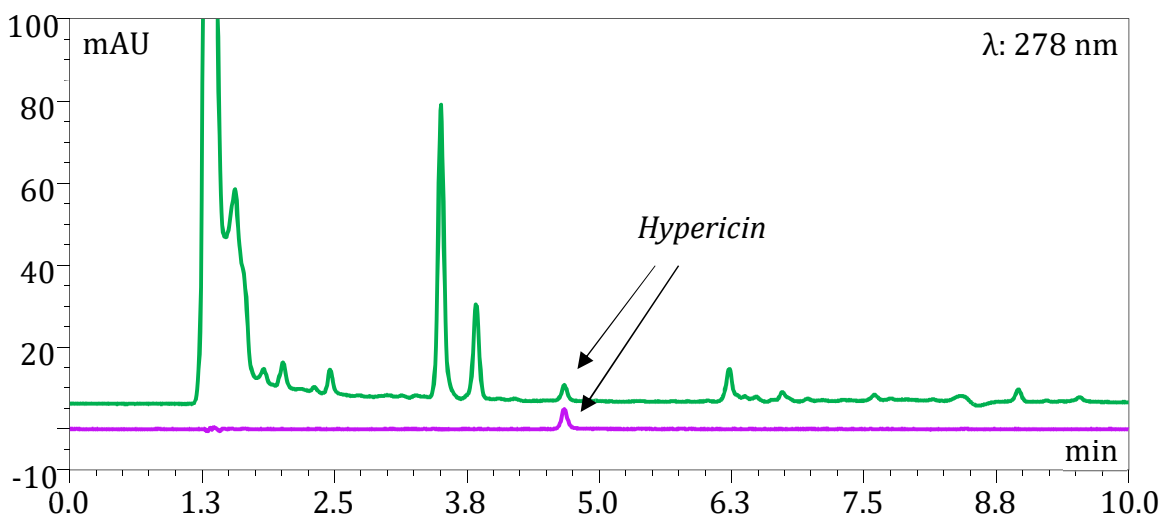
HPLC analýzy methanolvých extraktů listu, květu, nati a kořene třezalky tečkované pomocí metody č. 9 s využitím kolony Kinetex C18 jsou reprezentovány chromatogramy na Obr. 22 - 25. Pro snadnější identifikaci píku hypericinu je v chromatogramech přidán záznam analýzy standardu hypericinu v methanolu, získaný taktéž HPLC metodou č. 9 (fialová čára).



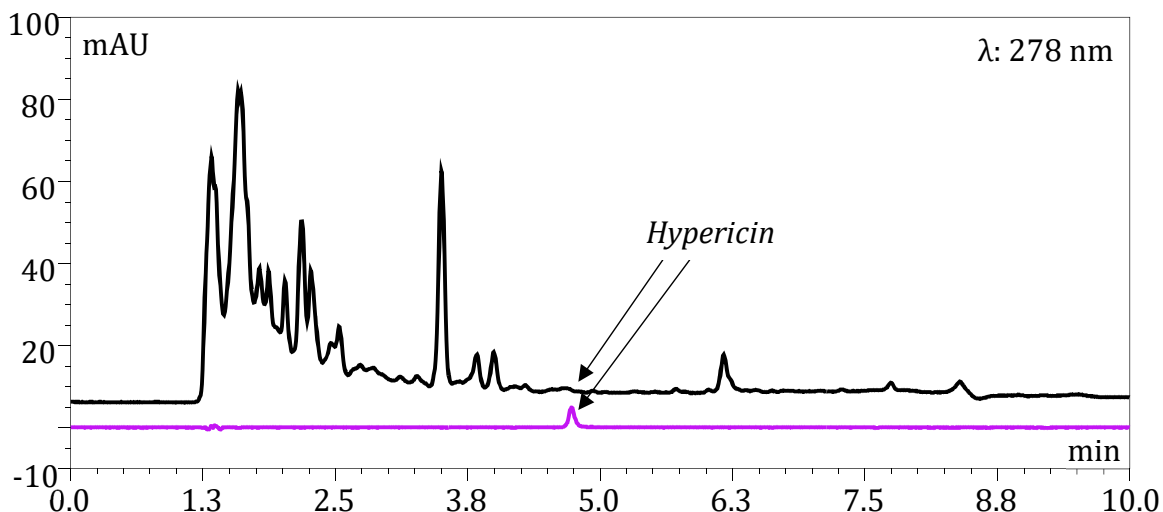
Obr. 22: Chromatografická analýza methanolvého extraktu vzorku listu třezalky tečkované (zelená čára) s využitím kolony Kinetex C18 a HPLC metody č. 9. Pro srovnání je též uveden chromatogram pro vzorek standardu hypericinu, získaný stejnou HPLC metodou (fialová čára).



Obr. 23: Chromatografická analýza methanolového extraktu vzorku květu třezalky tečkované (žlutá čára) s využitím kolony Kinetex C18 a HPLC metody č. 9. Pro srovnání je též uveden chromatogram pro vzorek standardu hypericinu, získaný stejnou HPLC metodou (fialová čára).



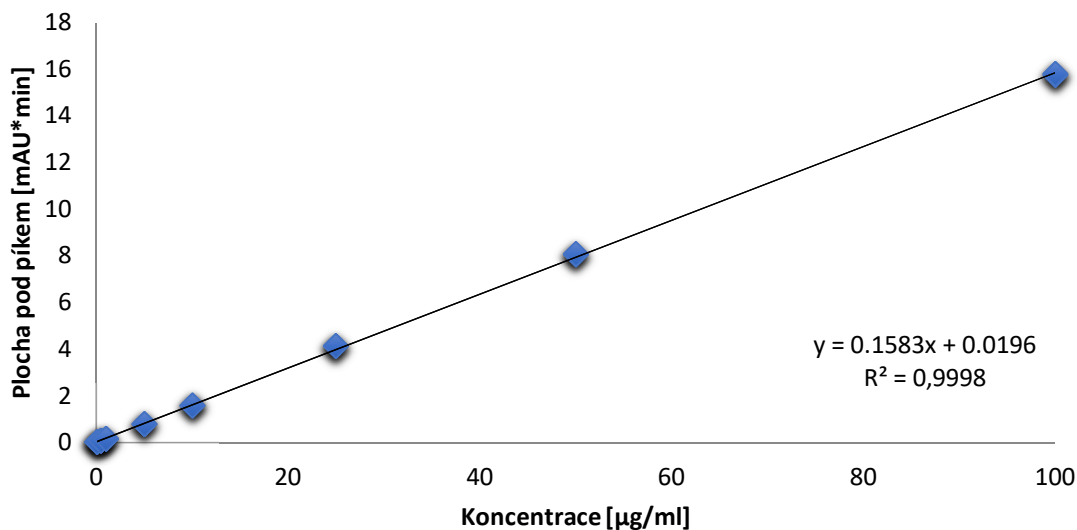
Obr. 24: Chromatografická analýza methanolového extraktu vzorku natě třezalky tečkované (zelená čára) s využitím kolony Kinetex C18 a HPLC metody č. 9. Pro srovnání je též uveden chromatogram pro vzorek standardu hypericinu, získaný stejnou HPLC metodou (fialová čára).



Obr. 25: Chromatografická analýza methanolvého extraktu vzorku kořene třezalky tečkované (černá čára) s využitím kolony Kinetex C18 a HPLC metody č. 9. Pro srovnání je též uveden chromatogram pro vzorek standardu hypericinu, získaný stejnou HPLC metodou (fialová čára).

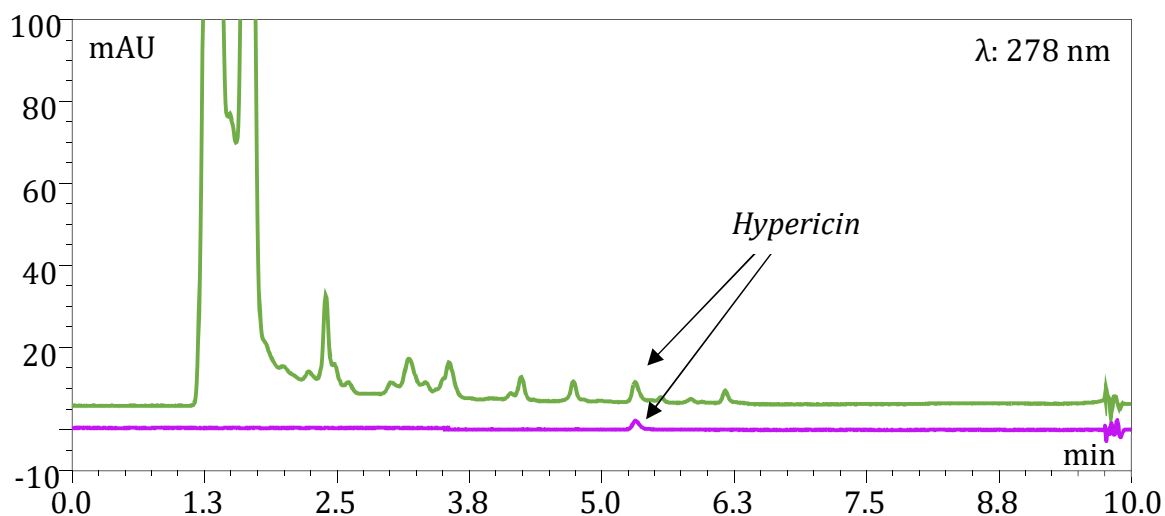
Kalibrační křivka získaná HPLC analýzou (metoda č. 9 v Tab. 5) 8 kalibračních úrovní standardu hypericinu s využitím kolony Kinetex PFP je znázorněna na Obr. 26.

Kalibrační křivka hypericinu

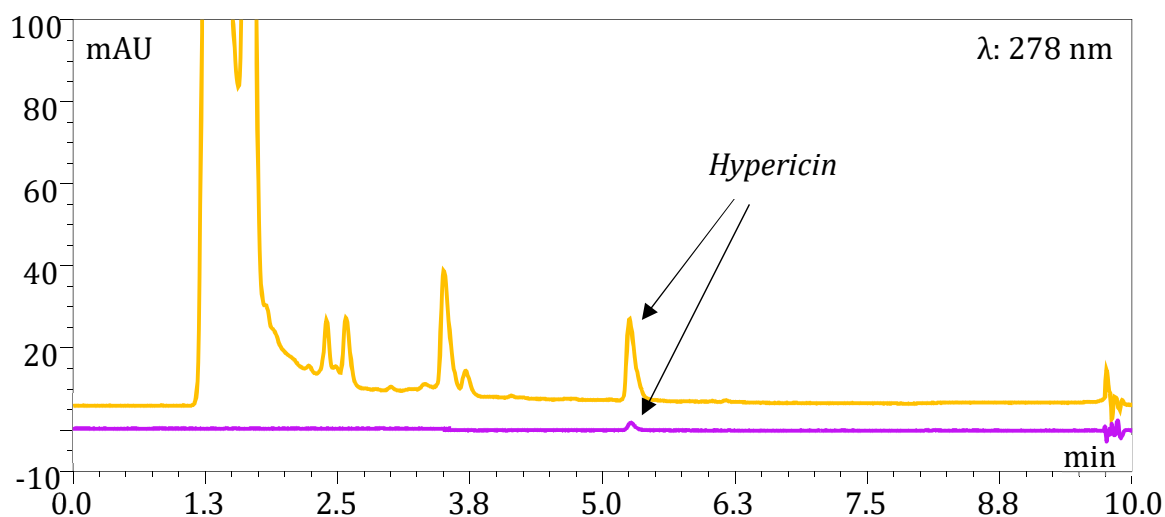


Obr. 26: Metoda externího standardu hypericinu ($c = 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50$ a $100 \mu\text{g/ml}$). Graf ukazuje závislost plochy pod píkem stanoveného standardu hypericinu na připravených koncentracích standardu hypericinu na koloně Kinetex PFP.

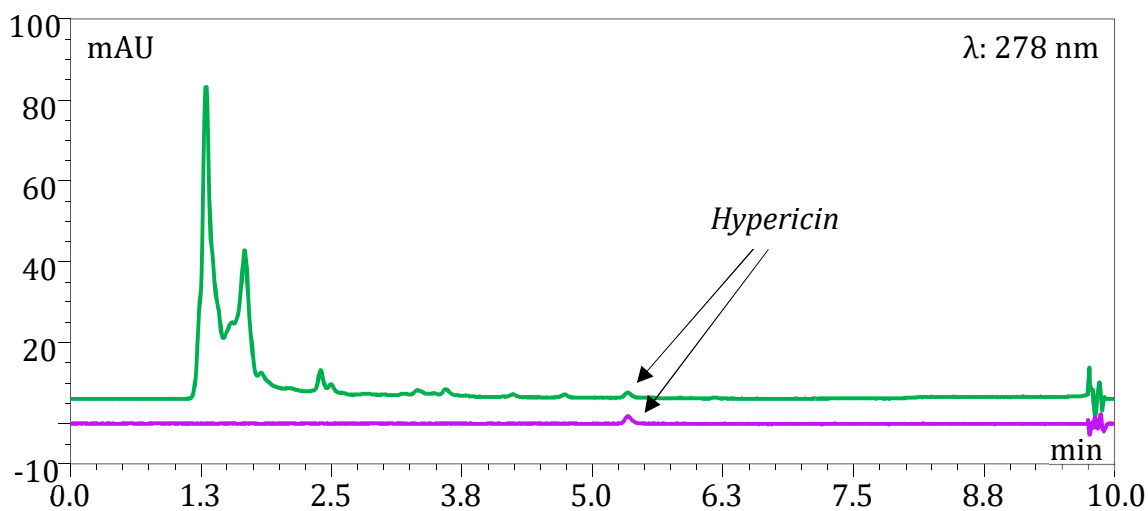
Podobně jsou výsledky získané HPLC analýzou methanolových extraktů rostlinných částí (tj. list, květ, nať a kořen) třezalky tečkované s využitím kolony Kinetex PFP představeny pomocí chromatogramů na Obr. 27 – 30.



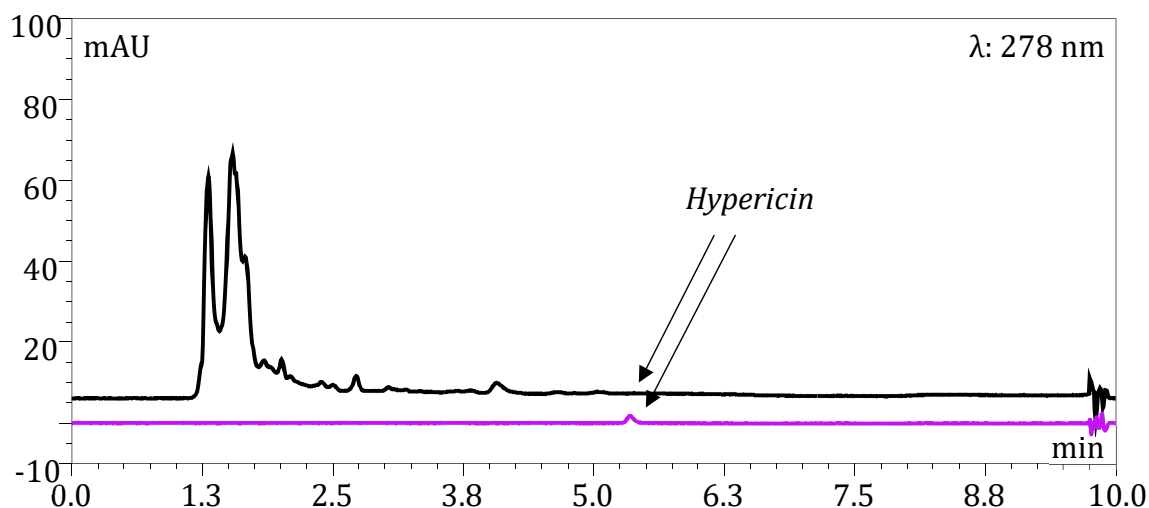
Obr. 27: Chromatografická analýza methanolového extraktu vzorku listu třezalky tečkované s využitím kolony Kinetex PFP a HPLC metody č. 9. Pro srovnání je též uveden chromatogram pro vzorek standardu hypericinu, získaný stejnou HPLC metodou (fialová čára).



Obr. 28: Chromatografická analýza methanolového extraktu vzorku květu třezalky tečkované s využitím kolony Kinetex PFP a HPLC metody č. 9. Pro srovnání je též uveden chromatogram pro vzorek standardu hypericinu, získaný stejnou HPLC metodou (fialová čára).



Obr. 29: Chromatografická analýza methanolového extraktu vzorku natě třezalky tečkované s využitím kolony Kinetex PFP a HPLC metody č. 9. Pro srovnání je též uveden chromatogram pro vzorek standardu hypericinu, získaný stejnou HPLC metodou (fialová čára).



Obr. 30: Chromatografická analýza methanolového extraktu vzorku kořene třezalky tečkované s využitím kolony Kinetex PFP a HPLC metody č. 9. Pro srovnání je též uveden chromatogram pro vzorek standardu hypericinu, získaný stejnou HPLC metodou (fialová čára).

Chromatografické vlastnosti píku hypericinu získané HPLC analýzou methanolových extraktů částí třezalky tečkované pomocí metody č. 9 (Tab. 5) jsou shrnuty v Tab. 7. Jsou zde uvedeny retenční časy hypericinu (R_t), šířky píku v polovině výšky ($w_{0,5}$) a $R_{L/P}^*$ je rozlišení píku hypericinu vzhledem k nejbližším píkům zleva (R_L) a zprava (R_P) v chromatogramu.

Kolona	Kinetex C18			
Vzorek	<i>k</i>	<i>R_t</i> [min]	<i>w</i> _{0,5} [min]	<i>R_{L/P}</i> *
List	2,57	4,68	0,06	7,73/5,49
Květ	2,56	4,66	0,06	7,04/8,00
Nať	2,58	4,69	0,06	15,61/8,34
Kořen	2,57	4,68	0,10	8,07/3,04

Kolona	Kinetex PFP			
Vzorek	<i>k</i>	<i>R_t</i> [min]	<i>w</i> _{0,5} [min]	<i>R_{L/P}</i> *
List	3,02	5,22	0,07	2,41/5,36
Květ	3,03	5,24	0,08	2,58/11,96
Nať	3,02	5,23	0,07	2,31/5,54
Kořen	3,01	5,21	0,13	2,18/4,83

Tab. 7: Přehled charakteristik píku hypericinu při separaci HPLC metodou č. 9 na kolonách Kinetex C18 a Kinetex PFP.

Hodnoty poměru detekčního signálu pro hypericin v methanolových extraktech třezalky tečkované při 278 nm a průměrného šumu na základní linii v oblasti 10-tinásobku *w*_{0,5} od hranic píku hypericinu (tj. S/N) jsou uvedeny v Tab. 8.

Kolona	Kinetex C18	Kinetex PFP
Vzorek	S/N	
List	52,3	21,6
Květ	165,0	73,0
Nať	15,2	14,3
Kořen	2,5	1,4

Tab. 8: Srovnání hodnot signálu pro hypericin oproti šumu na kolonách Kinetex C18 a Kinetex PFP, které byly získány HPLC analýzou methanolových extraktů částí třezalky tečkované.

V Tab. 9 je uvedeno srovnání hodnot přesnosti, správnosti a linearit metody č. 9, které byly získány HPLC analýzou vzorků kalibrační řady hypericinu na kolonách Kinetex C18 a Kinetex PFP.

Kolona	Kinetex C18	Kinetex PFP
Linearita [<i>R</i> ²]	0,9998	0,9998
Průměrná relativní přesnost [%]	1,77	2,66
Relativní přesnost na LLOQ [%]	3,14	11,23
Relativní přesnost na ULOQ [%]	0,63	0,13
Průměrná relativní správnost [%]	97,11	98,21
Relativní správnost na LLOQ [%]	94,04	94,74
Relativní správnost na ULOQ [%]	99,47	99,42

Tab. 9: Srovnání validačních charakteristik linearit, přesnosti a správnosti stanovení hypericinu HPLC metodou č. 9 pro kolony Kinetex C18 a Kinetex PFP.

V Tab. 9 je linearita metody č. 9 charakterizována koeficientem determinace R^2 , který byl stanoven jednoparametrovou lineární regresí hodnot plochy pod píkem a koncentrací hypericinu v rozsahu od 0,1 $\mu\text{g/ml}$ do 100 $\mu\text{g/ml}$. Relativní přesnost byla stanovena jako stem vynásobený podíl výběrové směrodatné odchylky určení plochy pod píkem hypericinu při určité koncentraci a průměru hodnot ploch pod píkem hypericinu. Relativní přesnost byla stanovena pro všechny kalibrační hladiny, které byly analyzovány 3x. Průměrná relativní přesnost je aritmetický průměr relativních přesností na všech stanovených koncentračních hladinách. Koncentrace 0,1 $\mu\text{g/ml}$ byla přitom vzata jako spodní limit kvantifikace (LLOQ) a koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$ za horní limit kvantifikace (ULOQ) metody č. 9.

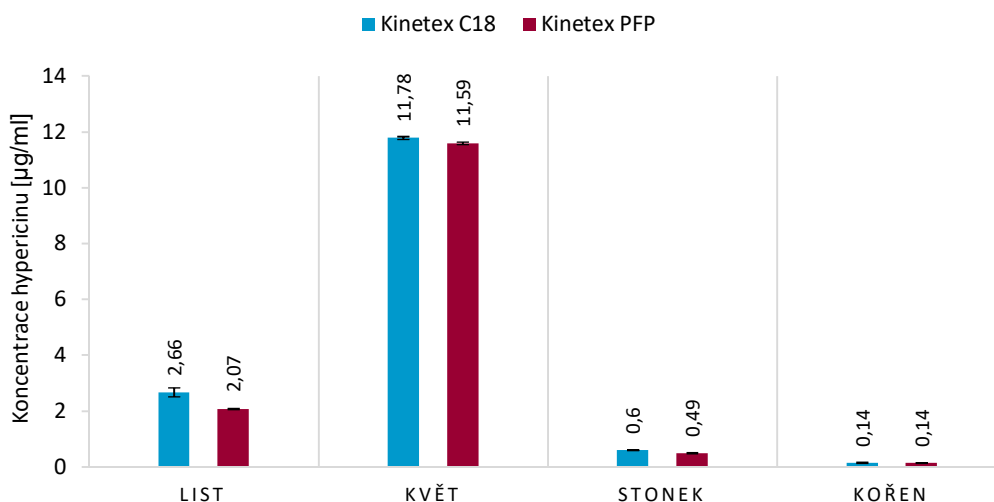
Relativní správnost byla určena jako stonásobek podílu koncentrace stanovené na základě kalibrační rovnice a nominální koncentrace hypericinu. Tyto relativní správnosti byly vypočítány pro všechny kalibrační hladiny. Hodnoty pro LLOQ a ULOQ jsou v Tab. 9 uvedeny zvlášť. Dále byl z hodnot relativních správností pro všechny koncentrační hladiny kalibrační série stanoven aritmetický průměr (tj. určena průměrná relativní správnost metody).

Výsledky kvantifikace hypericinu v jednotlivých částech (tj. list, květ, nať, kořen) třezalky tečkované je popsány v Tab. 10. a znázorněny na Obr. 31. Jsou zde uvedeny aritmetické průměry stanovených koncentrací hypericinu ve 3 měřeních a odpovídající výběrové směrodatné odchylky (SO).

Kolona	Kinetex C18	Kinetex PFP
Koncentrace hypericinu v extraktu z listu \pm SO [$\mu\text{g/ml}$]	2,66 \pm 0,16	2,07 \pm 0,03
Koncentrace hypericinu v extraktu z květu \pm SO [$\mu\text{g/ml}$]	11,78 \pm 0,05	11,59 \pm 0,04
Koncentrace hypericinu v extraktu z natě \pm SO [$\mu\text{g/ml}$]	0,60 \pm 0,007	0,49 \pm 0,02
Koncentrace hypericinu v extraktu z kořene \pm SO [$\mu\text{g/ml}$]	0,14 \pm 0,02	0,14 \pm 0,007

Tab. 10: Kvantifikace hypericinu v jednotlivých částech (tj. list, květ, nať, kořen) třezalky tečkované pro kolony Kinetex C18 a Kinetex PFP.

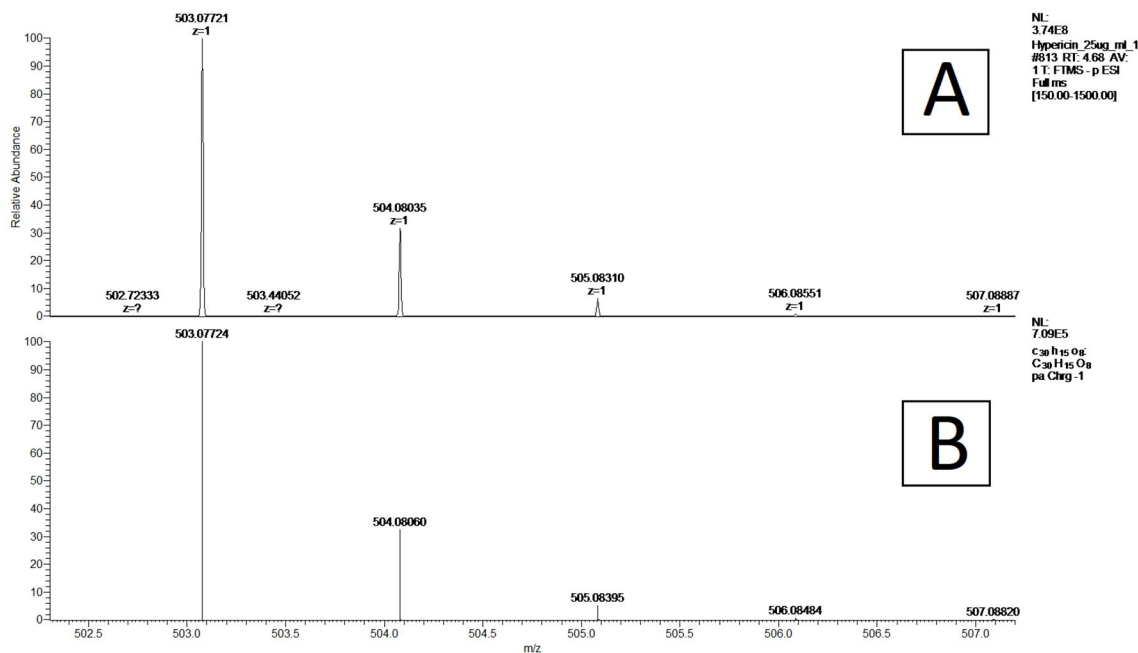
KVANTIFIKACE HYPERICINU



Obr. 31: Grafické znázornění kvantifikace hypericinu v jednotlivých částech (tj.: list, květ, nať, kořen) třezalky tečkované na koloně Kinetex C18 a koloně Kinetex PFP HPLC metodou č. 9 (více o ní v Tab. 5). Chybové úsečky naznačují výběrovou směrodatnou odchylku průměrné koncentrace hypericinu určené třemi analýzami.

3.6.2 Identifikace hypericinu pomocí vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie

Jelikož použitý analytický systém Dionex Ultimate 3000 neumožnil spolehlivou identifikaci hypericinu především v rámci analýz methanolových extraktů částí třezalky tečkované, bylo provedeno ověření identity píku pomocí HRMS na přístroji Q Exactive Plus. HRMS spektrum získané v rámci LC-MS/MS analýzy standardního roztoku hypericinu ($c = 25 \mu\text{g/ml}$ v methanolu) analytickou metodou č. 9 na koloně Kinetex C18 je uvedeno na Obr. 32. Pro ilustraci vysoké přesnosti určení m/z iontu hypericinu zbaveného jednoho protonu (tj. $[\text{M-H}]^- = 503.077$) je přidáno v Obr. 32 i teoretické hmotnostní spektrum včetně izotopové obálky. Analogické výsledky byly získány analýzou na koloně Kinetex PFP. Fragmentační spektrum hypericinu je uvedeno v příloze jako Obr. P1.

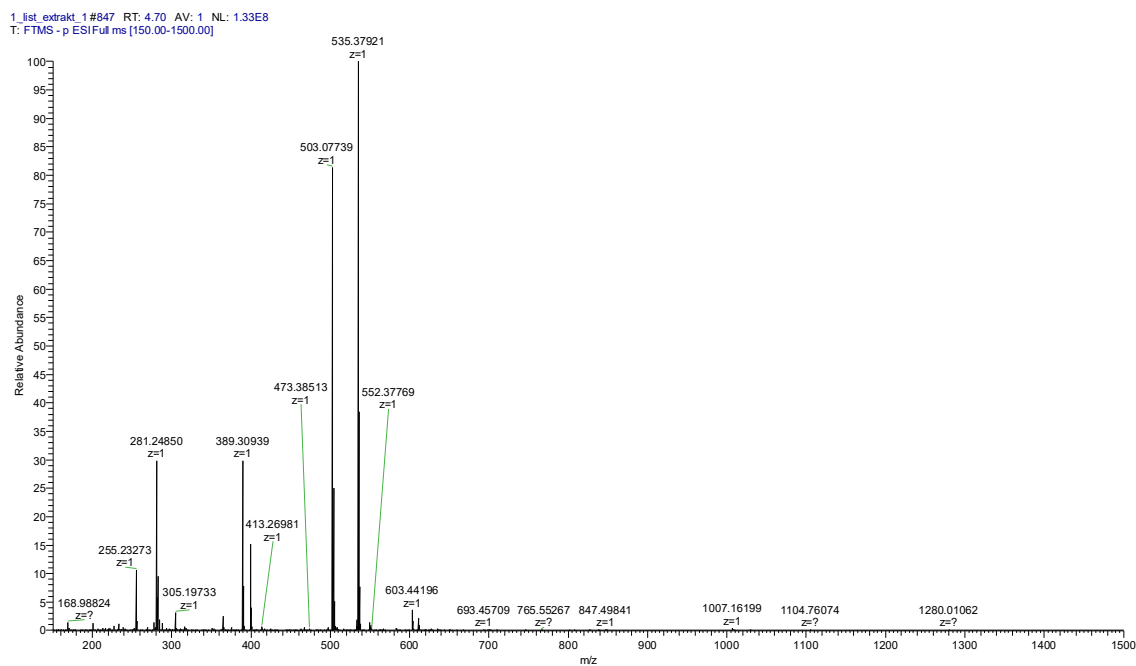


Obr. 32: Experimentální (A) a predikované (B) hmotnostní spektrum s vysokým rozlišením (HRMS) pro hypericinový aniont $[M-H]$.

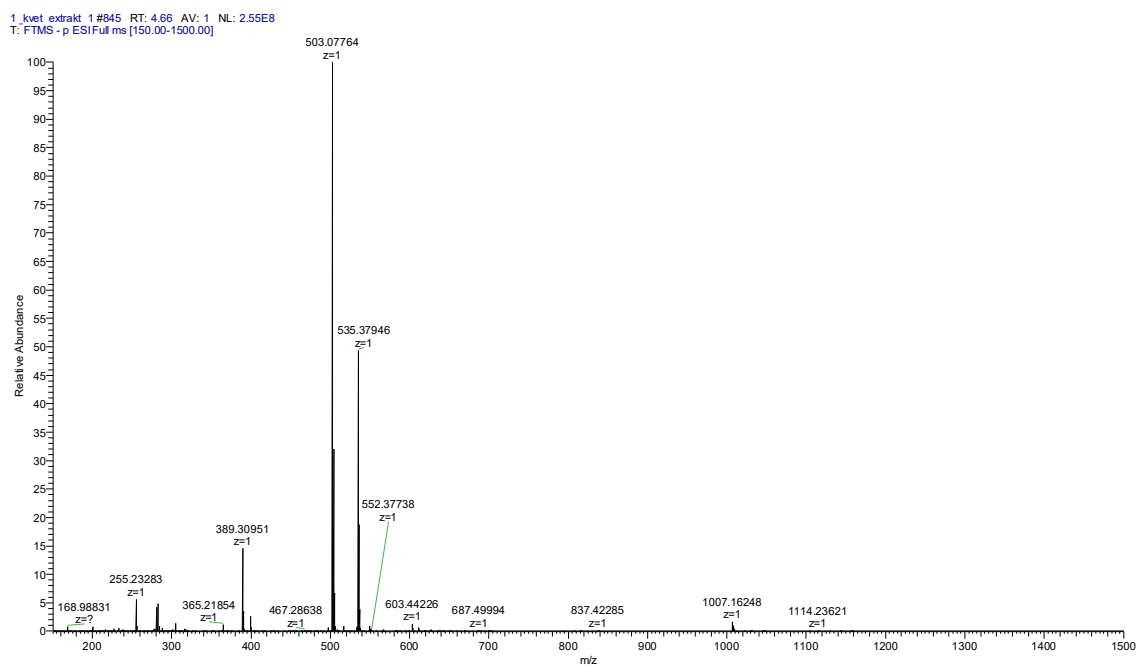
3.6.3 Ověření čistoty chromatografických píků hypericinu pomocí HRMS

V rámci finálních HPLC analýz hypericinu v methanolových extraktech z částí třezalky tečkované bylo nutné spolehlivě ověřit, zda je pík hypericinu v získaných chromatogramech skutečně čistý $[m/z = 503.077]$, a nedochází během analýzy ke koeluci dalších látek s podobnými vlastnostmi ve stejném retenčním čase. Tato informace je klíčová pro rozhodnutí, která z použitých chromatografických kolon má výhodnější separační vlastnosti. Vzhledem k dostupné instrumentaci na pracovišti, kde byla bakalářská práce prováděna, byl pro tyto účely použit hmotnostní spektrometr Q Exactive Plus. Nastavení MS je uvedeno v kapitole 3.5.1.

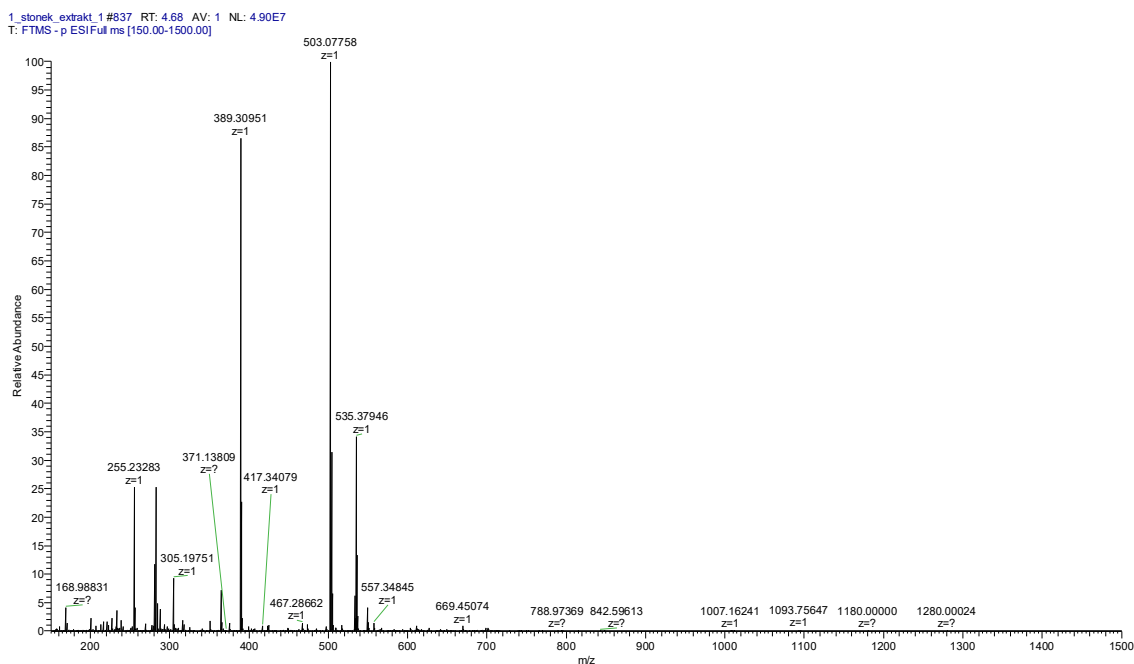
Výsledky HRMS analýz jsou demonstrovány hmotnostními spektry, která byla odečtena ve vrcholu chromatografických píků připisovaných hypericinu. HRMS spektra vyjadřující čistotu píku hypericinu v rámci analýzy methanolových extraktů listu, květu, nati a kořene třezalky tečkované metodou č. 9 s využitím chromatografické kolony Kinetex C18 jsou uvedeny na Obr. 33 – 36. Na základě těchto HRMS spekter lze posoudit čistotu píku hypericinu získaných při prováděných HPLC analýzách.



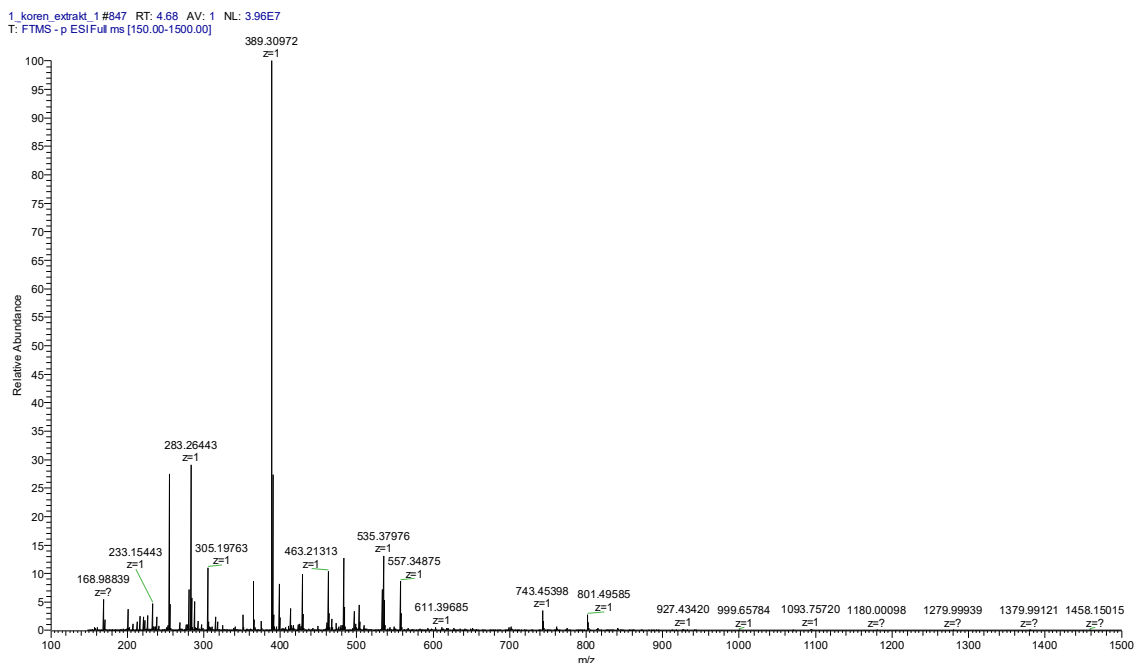
Obr. 33: Hmotnostní spektrum odečtené ve vrcholu chromatografického píku hypericinu stanoveném HPLC analýzou vzorku listu třezalky tečkované na koloně Kinetex C18.



Obr. 34: Hmotnostní spektrum odečtené ve vrcholu chromatografického píku hypericinu stanoveném HPLC analýzou vzorku květu třezalky tečkované na koloně Kinetex C18.

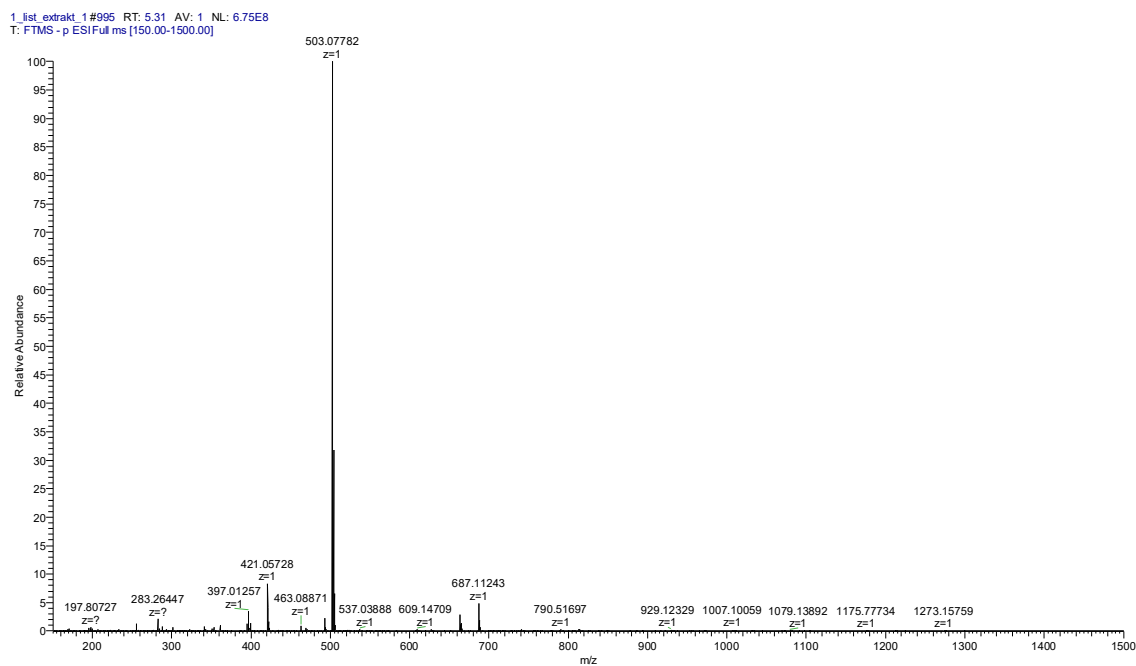


Obr. 35: Hmotnostní spektrum odečtené ve vrcholu chromatografického píku hypericinu stanoveném HPLC analýzou vzorku natě třezalky tečkované na koloně Kinetex C18.

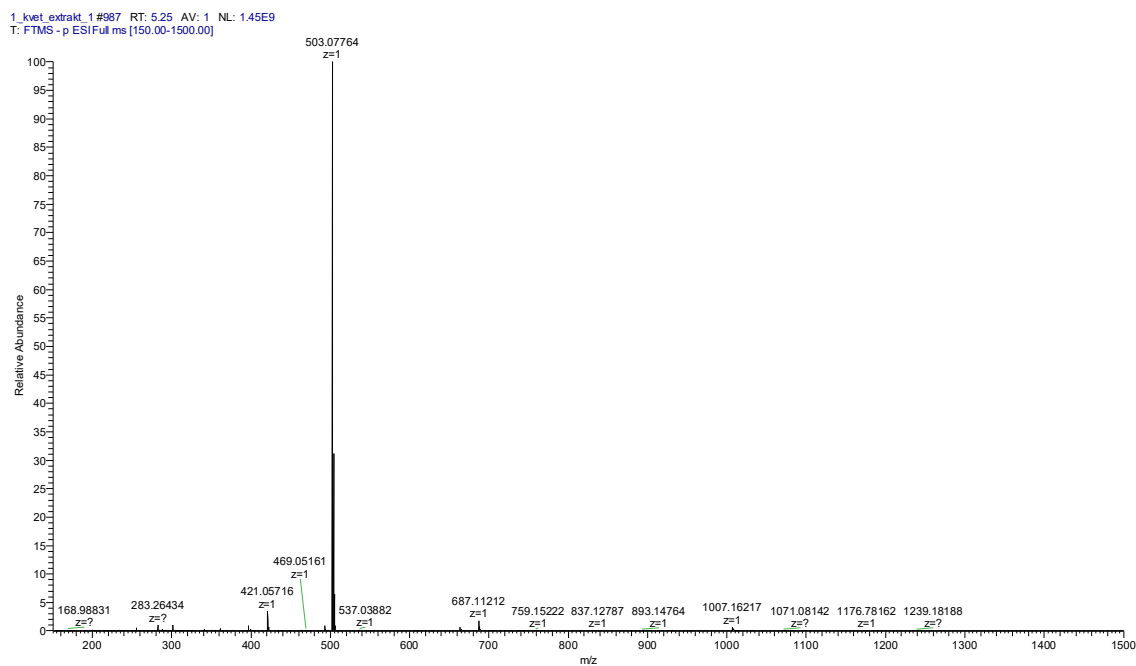


Obr. 36: Hmotnostní spektrum odečtené ve vrcholu chromatografického píku hypericinu stanoveném HPLC analýzou vzorku kořene třezalky tečkované na koloně Kinetex C18.

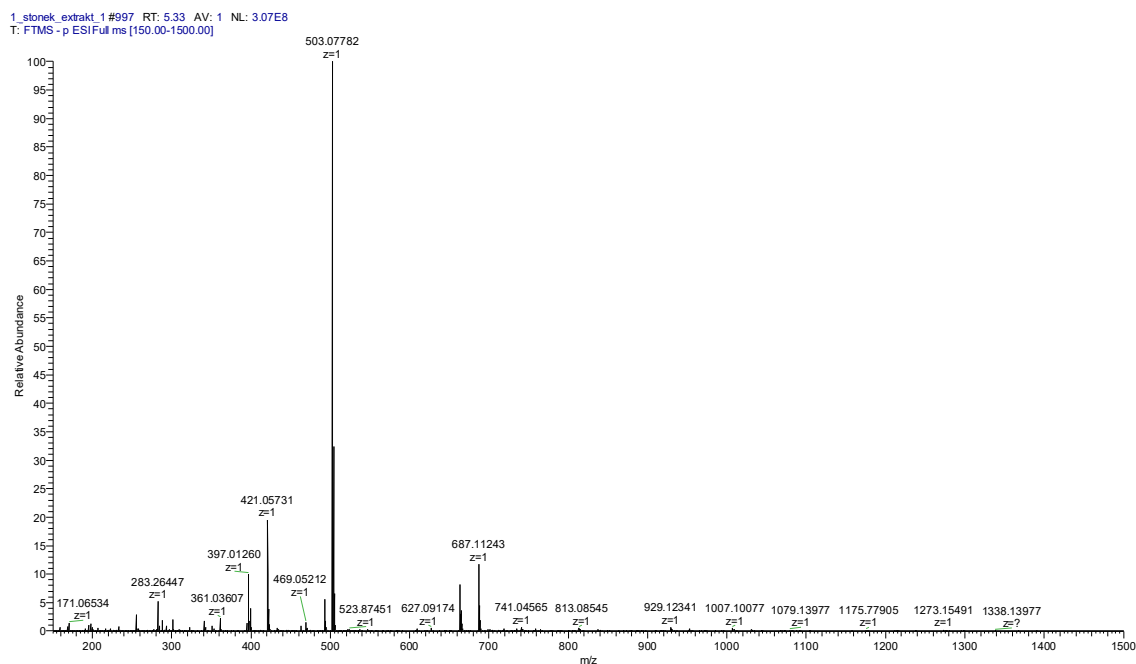
Podobně byla odhadnuta čistota píku hypericinu pomocí HRMS při HPLC analýzách (metoda č. 9 uvedená v Tab. 5) vzorků třezalky tečkované na koloně Kinetex PFP. HRMS spektra demonstrující čistotu píku hypericinu jsou uvedena na Obr. 37 - 40.



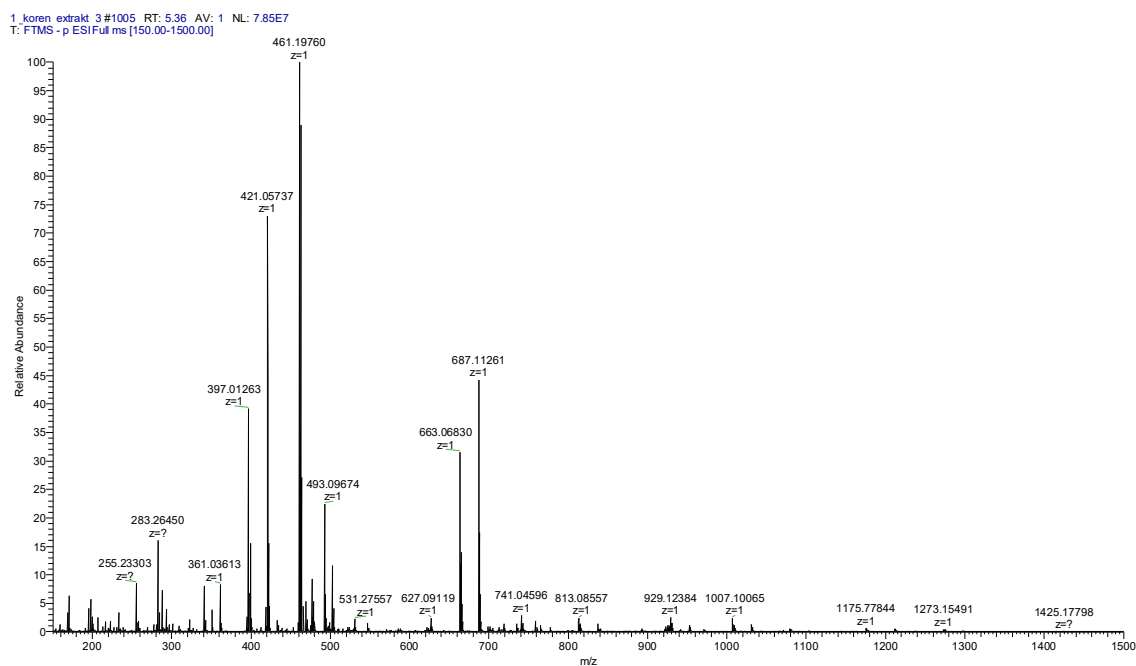
Obr. 37: Hmotnostní spektrum odečtené ve vrcholu chromatografického píku hypericinu stanoveném HPLC analýzou vzorku listu třezalky tečkované na koloně Kinetex PFP.



Obr. 38: Hmotnostní spektrum odečtené ve vrcholu chromatografického píku hypericinu stanoveném HPLC analýzou vzorku květu třezalky tečkované na koloně Kinetex PFP.



Obr. 39: Hmotnostní spektrum odečtené ve vrcholu chromatografického píku hypericinu stanoveném HPLC analýzou vzorku natě třezalky tečkované na koloně Kinetex PFP.



Obr. 40: Hmotnostní spektrum odečtené ve vrcholu chromatografického píku hypericinu stanoveném HPLC analýzou vzorku kořene třezalky tečkované na koloně Kinetex PFP.

Záznamy iontových chromatogramů (tj. FS) a extrahovaných iontových chromatogramů pro hypericin (tj. XIC) pro jednotlivé LC-MS analýzy částí třezalky tečkované na obou studovaných chromatografických kolonách jsou uvedeny v příloze jako Obr. P2 – P18.

4 Diskuze

Předložená bakalářská práce je zaměřena na vývoj optimální HPLC metody pro stanovení hypericinu v rostlinných částech třezalky tečkované sbírané v červnu 2016 v Třeboni pomocí chromatografických kolon Kinetex C18, 150 x 3 mm / 2,6 μm , 100 Å a Kinetex PFP, 150 x 4,6 mm / 5 μm , 100 Å. Taktéž nabízí statistické srovnání výsledků HPLC analýz na obou použitých kolonách. Methanolové extrakty rostlinných částí (tj. list, květ, nať, kořen) byly analyzovány optimální HPLC metodou s využitím UV-VIS spektroskopie a potvrzení identity hypericinu bylo provedeno vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií.

V rámci bakalářské práce byl nejprve analyzován vzorek standardu hypericinu třemi elučními módy: normálním, polárně organickým a reverzním. Bylo zjištěno, že hypericin vykazuje značnou afinitu jak ke stacionární fázi typu C18, tak k fázi PFP. Proto bylo nutné používat systémy mobilních fází s relativně vysokou eluční silou. Normální eluční mód s využitím hexanu, či hexanu s přídatkem 5 % (v/v) propan-2-olu vedl k vysokému retenčnímu času hypericinu na obou typech studovaných chromatografických kolon, a proto nebyl dále zkoumán. V polárně organickém elučním módu (např. s využitím MeOH a MeOH s polarizačními aditivy) byl naopak pík hypericinu vymyt ze stacionární fáze v mrtvém čase. Ani tento eluční mód se proto neukázal být vhodný pro další optimalizaci. Významné zlepšení bylo dosaženo HPLC analýzami v reverzním elučním režimu. Pro optimalizaci HPLC metody ke stanovení hypericinu byla zvolena strategie screeningu různých mobilních fází, kombinujících H_2O , MeOH, ACN, FA, AA a TEA. Všechny HPLC metody byly nastaveny na délku analýzy 10 minut a byly založeny na gradientové eluci, kde vzrůstal podíl organické složky od 50 % či 85 % do 100 %. Cílem bylo vyvinout krátkou a citlivou HPLC metodu s UV-VIS detekcí.

Ve stručnosti lze říci, že pokud byl v mobilní fázi použit MeOH místo ACN, došlo by ke zvýšení retenčního času hypericinu. Například metoda č. 2, využívající ACN, na koloně Kinetex C18, 150 x 3 mm / 2,6 μm , 100 Å poskytla hypericin s $k = 1,34$ ($R_t = 3,07$ min), kdežto metoda č. 5, využívající MeOH, s $k = 5,13$ ($R_t = 8,03$ min). Podobné poměry retenčních časů hypericinu byly pozorovány při použití metod č. 2 a č. 5 na koloně Kinetex PFP, 150 x 4,6 mm / 5 μm , 100 Å (č. 2: $k = 2,55$; $R_t = 4,61$, č. 5: s $k = 6,08$; $R_t = 9,20$). Ačkoli použitá kolona Kinetex PFP, 150 x 4,6 mm / 5 μm , 100 Å má vyšší vnitřní průměr (ID = 4,6 mm) a větší částice (5 μm) než kolona Kinetex C18, 150 x 3 mm / 2,6 μm , 100 Å (ID = 3 mm, 2,6 μm), lze afinitu hypericinu k oběma kolonám porovnávat pomocí kapacitních faktorů i retenčních časů, protože mrtvé retenční časy jsou pro obě kolony velmi podobné ($t_0(\text{Kinetex C18}) = 1,31$ minut, $t_0(\text{Kinetex PFP}) = 1,30$ minut).

Pokud srovnáme všech 9 studovaných HPLC metod založených na reverzním elučním módu lze vyslovit závěr, že kolona Kinetex PFP zadržuje hypericin relativně silněji než kolona Kinetex C18. Pokud je v mobilní fázi přítomný vyšší podíl kyselin jako polarizačních aditiv, dochází na obou typech použitých stacionárních fází ke zvýšení retence hypericinu. Naopak vyšší podíl TEA v mobilní fázi vede ke snížení

retence hypericinu na obou typech stacionárních fází. Tyto jevy jsou poměrně snadno vysvětlitelné na základě stupně ionizace hypericinu způsobeném pH mobilní fáze. V bazickém prostředí je disociace hypericinu jakožto slabé kyseliny posílena, kdežto v kyselém prostředí je potlačena. Pokud je majoritní forma hypericinu ionizovaná, dochází ke snížení lipofility molekuly, a tím také ke snížení retence jak na koloně Kinetex C18, tak na koloně Kinetex PFP.

Za optimální HPLC metodu pro stanovení hypericinu byla na základě analýzy standardu hypericinu vybrána gradientová metoda č. 9 o délce 10 minut. Jako mobilní fáze zde byla použita směs: MF A: H₂O + 100 mM AA + 100 mM TEA a MF B: ACN + 100 mM AA + 100 mM TEA. Separáčnı́ účinnost této metody byla ověřena HPLC analýzou vzorku methanolového extraktu nati třezalky tečkované. Ukázalo se, že metoda č. 9 poskytuje nejvýhodnější výsledky, pokud jde o šířku píku hypericinu v polovině výšky, jeho asymetrii a rozlišení. Ve srovnání s metodou č. 8, kde byla použita 10x nižší koncentrace AA a TEA, vykázala metoda č. 9 v případě separace hypericinu lepší chromatografické parametry. Tento jev lze přičíst vyšší iontové síle mobilní fáze metody č. 9. Díky vyšší koncentraci iontů v mobilní fázi metody č. 9 bylo ve srovnání s metodou č. 8 dosaženo vyššího retenčního času hypericinu, avšak pík byl více komprimovaný, jak vyplývá z nižších hodnot $w_{0,5}$. Společně s dalšími chromatografickými parametry byl proto učiněn závěr, že metoda č. 9 vykazuje relativně nejvýhodnější vlastnosti a může být použita pro kvantifikaci hypericinu v methanolových extraktech částí třezalky tečkované.

Ke kvantifikaci hypericinu v methanolových extraktech z třezalky tečkované byla zvolena metoda externího standardu, čili metoda kalibrační křivky. HPLC metoda č. 9 měla rozsah 0,1 – 100 µg/ml. Její linearita byla pro případ kolony Kinetex C18 i Kinetex PFP potvrzena koeficientem determinance $R^2 = 0,9998$. Jak vyplývá z regresních rovnic charakterizujících obě kalibrace, je metoda s využitím kolony Kinetex C18 citlivější než v případě analýzy na koloně Kinetex PFP. Metoda č. 9 poskytuje na obou chromatografických kolonách uspokojivé hodnoty přesnosti a správnosti, ačkoli pro kolonu Kinetex PFP relativní přesnost na úrovni LLOQ je vyšší než 10 % a relativní správnost nižší než 95 %.

Pomocí analytické metody č. 9 a chromatografické kolony Kinetex C18 byl ve vzorcích methanolových extraktů částí třezalky tečkované kvantifikován tento obsah hypericinu: list = $2,66 \pm 0,16$ µg/ml, květ = $11,78 \pm 0,05$ µg/ml, nať = $0,60 \pm 0,007$ µg/ml, kořen = $0,14 \pm 0,02$ µg/ml. Podobné hodnoty poskytla analýza s využitím kolony Kinetex PFP: list = $2,07 \pm 0,03$ µg/ml, květ = $11,59 \pm 0,04$ µg/ml, nať = $0,49 \pm 0,002$ µg/ml, kořen = $0,14 \pm 0,007$ µg/ml. Výsledky obdržené HPLC analýzami na obou typech kolon jsou téměř srovnatelné. Je zajímavé si povšimnout, že v případě listu, květu a nati třezalky tečkované poskytuje metoda s využitím kolony Kinetex PFP systematicky nižší hodnoty koncentrace hypericinu. Ačkoli interpretace stanovených hodnot koncentrací hypericinu v jednotlivých částech třezalky tečkované překračuje rámeček této bakalářské práce, bylo též velmi překvapivé, že nejvíce hypericinu bylo stanoveno v methanolovém extraktu žlutých květů třezalky tečkované.

Pokud jde o přínos PFP skupiny na separaci hypericinu ve srovnání s klasickou reverzní fází typu C18, je nutné říct, že mezi oběma typy použitých stacionárních fází nebyl během HPLC analýz zaznamenán žádný markantní rozdíl. Avšak tento názor nemohl být akceptován, dokud neproběhlo ověření čistoty píku hypericinu v získaných chromatogramech pomocí HRMS. Analýzy chromatografického píku hypericinu pomocí HRMS ukázaly, že v případě separace na koloně Kinetex C18 dochází k poměrně výraznější koeluci dalších látek současně s hypericinem. HRMS sken zaznamenaný ve vrcholu píku, který je přisuzován hypericinu prokázal, že jeho významnou část vytváří také ionty s $m/z = 535,379$ ($z = -1$) a $m/z = 389,309$ ($z = -1$). V případě analýzy květu je dominantní složkou píku hypericin ($m/z = 503,077$ ($z = -1$)), avšak ve vzorcích listu, nati a kořene vykazují vyšší intenzitu jiné ionty než hypericin. Na základě HRMS lze tedy říci, že metoda č. 9 s využitím kolony Kinetex C18 neposkytuje pík hypericinu s vysokou čistotou. Nejvýznamnější látkou, která pík hypericinu kontaminuje je pravděpodobně hyperforin (vypočítané $m/z = 535,37928$). Je nutné též připomenout, že dle výpočtu mají hypericin a hyperforin stejné hodnoty Clog $D_{7,4}$, což předznamenává podobnou afinitu ke stacionární fázi typu C18. Kvantifikace hypericinu pomocí UV-VIS detektoru však může jev koeluce minimalizovat, pokud je citlivost při použité vlnové délce 278 nm vůči ostatním látkám značně nižší.

Poměrně lepší výsledky separace byly zjištěny pro případ HPLC analýzy s využitím kolony Kinetex PFP. V případě analýzy methanolového extraktu květu, nati a listu třezalky tečkované bylo pomocí HRMS prokázáno, že dominantní složkou píku, který byl přisuzován hypericinu, je ion s $m/z = 503,077$ ($z = -1$), tedy skutečně hypericin. Ostatní ionty koelují s hypericinem v podstatně nižším relativním zastoupení než v případě HPLC analýzy na koloně Kinetex C18. HRMS spektrum získané při HPLC analýze vzorku methanolového extraktu kořene třezalky tečkované ukazuje přítomnost mnoha jiných iontů než hypericinu, což je dáno jeho velmi nízkou koncentrací v této části rostliny. Obecně lze ale říci, že kolona Kinetex PFP separuje pík hypericinu s mnohem vyšší účinností než kolona Kinetex C18. Koeluce hypericinu s hyperforinem se tedy zjevně na koloně Kinetex PFP neuplatňuje, protože hyperforin má velmi odlišný konjugovaný systém π -elektronů a jeho interakce se skupinou PFP je jiná než v případě hypericinu. Předpoklad bakalářské práce, že stacionární fáze s PFP skupinou vykáže vyšší separační účinnost pro polyaromatické látky, se tedy v případě hypericinu potvrdil.

Závěr

Smyslem této bakalářské práce bylo srovnání kolon typu Kinetex C18, 150 x 3 mm / 2,6 μ m, 100 Å a Kinetex PFP, 150 x 4,6 mm / 5 μ m, 100 Å v rámci HPLC separace polyfenolických látek, a to především hypericinu, z methanolových extraktů rostlinných částí třezalky tečkované (tj. list, květ, nať a kořen). Dále pak bylo cílem získané poznatky dobře využít při stanovení obsahu hypericinu v těchto jednotlivých částech třezalky tečkované.

Použitá kolona Kinetex C18, 150 x 3 mm / 2,6 μ m, 100 Å se v normálním ani polárně organickém módu neosvědčila pro nalezení optimální HPLC metody k separaci hypericinu z rostlinných částí třezalky tečkované. Avšak v reverzním módu byla nalezena vhodnější HPLC metoda, u které byly ověřeny chromatografické vlastnosti, a byla dále optimalizována.

Na koloně Kinetex PFP, 150 x 4,6 mm / 5 μ m, 100 Å také nebylo zpočátku dosaženo požadovaných výsledků v normálním a polárně organickém módu pro separaci hypericinu z rostlinných částí třezalky tečkované. V reverzním módu byly ale stejně jako v případě kolony Kinetex C18, odhaleny výhodnější metody, které pak vedly k nalezení optimální metody v rámci této práce.

Během většiny analýz bylo postupně zjištěno, že stacionární fáze s PFP skupinou separuje hypericin od ostatních složek v methanolových extraktech z třezalky tečkované s podobnou účinností jako klasická stacionární fáze typu C18. Rozhodující informace však přinesla až HRMS analýza, která odhalila, že pík hypericinu eluovaný z chromatografické kolony typu PFP je mnohem čistší než v případě separace na koloně typu C18, protože ve stejném retenčním čase se nevymývá tak významné množství jiných látek. Pracovní hypotéza stanovená na počátku bakalářské práce byla tedy nakonec potvrzena, protože stacionární fáze s PFP skupinou vykazala příznivý vliv na separaci studovaných polyaromatických látek.

Chromatografická kolona s PFP skupinou, proto může být doporučena pro další analýzy polyaromátů v HPLC. Vhodné by ovšem bylo použít chromatografickou kolonu s menšími částicemi a nižším vnitřním průměrem, než tomu bylo v této bakalářské práci. Tato technická úprava by umožnila snížit průtok mobilní fáze, a tím redukovat její spotřebu během analýzy, a pravděpodobně by vedla ještě k výhodnější separaci polyaromátů.

Seznam použitých zkratek

(v/v)	Objemová procenta
AA	Kyselina octová (Acetic Acid)
ACN	Acetonitril
AGC	Kontrola automatického zisku (Automatic Gain Control)
AIF	Režim fragmentace všech iontů (All Ion Fragmentation)
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure PhotoIonization)
C18	<i>n</i> -oktadecyl
CAD	Detektor nabitého aerosolu (Charged Aerosol Detector)
CC	Kolonová chromatografie (Column Chromatography)
CNS	Centrální nervová soustava
ELSD	Vypařovací detektor rozptylu světla (Evaporative Light Scattering Detector)
ES	Evropská standardní definice rozlišení
ESI	Ionizace elektrosprejem (Electro Spray Ionization)
FA	Kyselina mravenčí (Formic Acid)
FS	Režim plného skenu (Full Scan)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie (Gas-Liquid Chromatography)
GPC	Gelová permeační chromatografie (Gel-Permeation Chromatography)
GSC	Plynová absorpční chromatografie (Gas-Solid Chromatography)
HIC	Hydrofobní interakční chromatografie (Hydrophobic Interaction Chromatography)
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie (Hydrophilic Interaction Chromatography)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HRMS	Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (High-Resolution Mass Spectrometry)
IEC	Iontově výměnná chromatografie (Ion-Exchange Chromatography)
LC	Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)
LLC	Kapalinová rozdělovací chromatografie (Liquid-Liquid Chromatography)
LLE	Extrakce kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction)
LLOQ	Spodní limit kvantifikace (Lower Limit of Quantification)
LSC	Kapalinová absorpční chromatografie (Liquid-Solid Chromatography)
MeOH	Methanol

MF A	Mobilní fáze A (Mobile phase A)
MF B	Mobilní fáze B (Mobil phase B)
MOA	Monoaminoxidáza
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
NCE	Normalizovaná kolizní energie
PC	Papírová chromatografie (Paper Chromatography)
PFP	Pentafluorfenyl
PS-DVB	Polystyrendivinylbenzen
RPM	Otáčky za minutu (Revolutions Per Minute)
SIM	Sledování jednoho iontu (Single Ion Monitoring)
SO	Výběrová směrodatná odchylka
SRM	Sledování jedné reakce (Single Reaction Monitoring)
TEA	Triethylamin
TLC	Tenkvrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
TMS	Trimethylsilyl
UHPLC	Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra High-Performance Liquid Chromatography)
ULOQ	Horní limit kvantifikace (Upper Limit of Quantification)
US	Definice pro rozlišení Spojených států amerických
UV-VIS	Ultrafialové viditelné záření (Ultraviolet – Visual)
UZ	Ultrazvuk (Ultra-sound)
XIC	Extrahovaný iontový chromatogram (Extracted-ion Chromatogram)

Použité zdroje a literatura

- [1] VONDRÁK, Dalibor a Jaroslav VULTERIN. *Analytická chemie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985, 264 s. ISBN 04-619-85.
- [2] KARLÍČEK, Rolf. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 4. nezměněné vydání. Praha: nakladatelství Karolinum, 2013. 281 s. ISBN 978-80-246-2202-6.
- [3] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2. Vydání. Ostrava: nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [4] TSWETT, M. S. *On a new category of adsorption phenomena and their application to Biochemical analysis*. Proceedings of the Warsaw Society of Naturalists, Biology Section. 1905, roč. 14, s. 20-39.
- [5] JAMES, A. T. a MARTIN, A. J. P.: *Gas-liquid partition Chromatography: the Separation and Micro-estimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid*. In: National Institute for Medical Research, London. 1952, 50, s. 679-690.
- [6] SYNGE, Richard L. M., Nobel Lecture: *Applications of Partition Chromatography*. Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 25 Jun 2017. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/syngelecture.html
- [7] CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Separace látek: kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. 2., nezm. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986.
- [8] KŘÍŽEK, Martin a Jan ŠÍMA. *Analytická chemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2015. ISBN 978-80-7394-486-5.
- [9] HUSSAIN, Khalid. *Theories of chromatography* [online]. 2012 [cit. 2017-06-29]. Dostupné z: https://www.slideshare.net/hussain_761/theories-of-chromatography
- [10] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [11] GRUSHKA, Eli. *Preparative-scale chromatography*. New York: M. Dekker, c1989. ISBN 0824780612.
- [12] ŘEHULKA, Pavel. *Separční metody používané v proteomice* [online]. 2017 [cit. 2017-06-29]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/7173503-Separacni-metody-pouzivane-v-proteomice.html>
- [13] BALLOVÁ, J. *Stanovení obsahu ergosterolu ve vybraných vzorcích pícnin*. Hradec Králové 2014. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Vlastimil Dohnal, Ph.D. et Ph.D.
- [14] DOUŠA, Michal. *Hplc.cz* [online]. Datum publikování: 2013-4-4. [citováno 2016-11-12]. Dostupné z: <http://hplc.cz/>
- [15] MOTYKA, Kamil a Eva SCHÜTZNEROVÁ. *Preparativní chromatografické metody*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2015. ISBN 978-80-244-4542-7.

- [16] LUNDANES, Elsa, Léon REUBSAET a Tyge GREIBROKK. *Chromatography: basic principles, sample preparations and related methods*. ISBN 978-3-527-33620-3.
- [17] DOUŠA, Michal. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2002. Učební texty pro pracovníky ÚKZÚZ. ISBN 80-86548-09-0.
- [18] LINDSAY, Sandie. *High performance liquid chromatography*. 2nd ed. New York: Published on behalf of Thames Polytechnic, London, by Wiley, 1992. Analytical Chemistry by Open Learning (Series). ISBN 978-0-471-93115-7.
- [19] PACÁKOVÁ, Věra a Karel ŠTULÍK. *High performance liquid chromatography*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1990.
- [20] HEGYI, György a Mihály KOVÁCS. *Introduction to Practical Biochemistry: Chromatographic methods* [online]. Eötvös Loránd University, 2012 [cit. 2017-06-29]. Dostupné z: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch06.html>
- [21] MEYER, Veronika. *Practical high-performance liquid chromatography*. 5th ed. Chichester, U.K.: Wiley, 2010. ISBN 978-0-470-68217-3.
- [22] KAZAKEVICH, Yuri. a Rosario. LOBRUTTO. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2007. ISBN 978-0-471-68162-5.
- [23] HARVEY, David. *Tailing and Fronting of Chromatographic Peaks* [online]. 2013 [cit. 2017-06-29]. Dostupné z: <http://community.asdlib.org/imageandvideoexchangeforum/2013/08/01/tailing-and-fronting-of-chromatographic-peaks/>
- [24] VITHA, Mark F. *Chromatography: principles and instrumentation*. ISBN 978-11-19270-88-1.
- [25] Thyrocare: Thyrocare Technologies Limited. *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* [online]. Navi Mumbai, 2016 [cit. 2017-07-09]. Dostupné z: <http://www.thyrocare.com/High-Performance-Liquid-Chromatography.html>
- [26] NOVÁK, M. *Separace a stanovení takrinových inhibitorů acetylcholinesterasy pomocí HPLC*. Hradec Králové 2016, Bakalářská práce na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce Prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.
- [27] SNYDER, Lloyd R., J. J. KIRKLAND a John W. DOLAN. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley, c2010. ISBN 978-0-470-16754-0.
- [28] JANDERA, Pavel a Jaroslav CHURÁČEK. *Gradient elution in column liquid chromatography: theory and practice*. New York: Elsevier, 1985. ISBN 0444421246.
- [29] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.

- [30] Sigma-Aldrich. *Basics of Chiral HPLC* [online]. 2017 [cit. 2017-05-24]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Posters/t408109h.pdf>
- [31] KARLSSON, Charlotte, Lars KARLSSON, Daniel W. ARMSTRONG a Paul K. OWENS. *Evaluation of a Vancomycin Chiral Stationary Phase in Capillary Electrochromatography Using Polar Organic and Reversed-Phase Modes*. Analytical Chemistry. 2000, 72(18), 4394-4401. DOI: 10.1021/ac0002792. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac0002792>
- [32] CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985. Knižnice technických aktualit.
- [33] COUFAL, Pavel. *Web.natur* [online]. Datum publikování: 1996-3-2. [citováno 2016-12-3]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [34] MCMASTER, Marvin C. *HPLC, a practical user's guide*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2007. ISBN 978-0-471-75401-5.
- [35] GÓMEZ-CARAVACA, Ana María, Vito VERARDO, Annachiara BERARDINELLI, Emanuele MARCONI a Maria Fiorenza CABONI. *A chemometric approach to determine the phenolic compounds in different barley samples by two different stationary phases: A comparison between C18 and pentafluorophenyl core shell columns*. Journal of Chromatography A. 2014, 1355(18), 134-142. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.06.007. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967314008887>
- [36] ŠMÍDOVÁ, Barbora, Dalibor ŠATÍNSKÝ, Kateřina DOSTÁLOVÁ a Petr SOLICH. *The pentafluorophenyl stationary phase shows a unique separation efficiency for performing fast chromatography determination of highbush blueberry anthocyanins*. Talanta [online]. 2017, 166, 249-254 [cit. 2017-07-25]. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.01.061. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914017301704>
- [37] HOLČAPEK, Michal, ed. *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS): sborník přednášek kurzu HPLC/MS pořádaného Spektroskopickou společností Jana Marka Marci a Univerzitou Pardubice 5. - 7. 11. 2001, Kongresová hala Univerzity Pardubice*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001. ISBN 80-7194-390-8.
- [38] FERRER, Imma a E. Michael THURMAN. *Liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry: principles, tools, and applications for accurate mass analysis*. Hoboken, N.J.: Wiley, c2009. Chemical analysis, v. 173. ISBN 978-0-470-13797-0.
- [39] HOFFMANN, Edmond de. a Vincent. STROOBANT. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Hoboken, NJ: J. Wiley, c2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [40] E. UGGERUD, S. Petrie, D. K. BOHME, F. TURECEK, D. SCHRÖDER, H. SCHWARZ, D. PLATTNER, T. WYTTENBACH, M. T. BOWERS, P. B. ARMENTROUT, S. A.

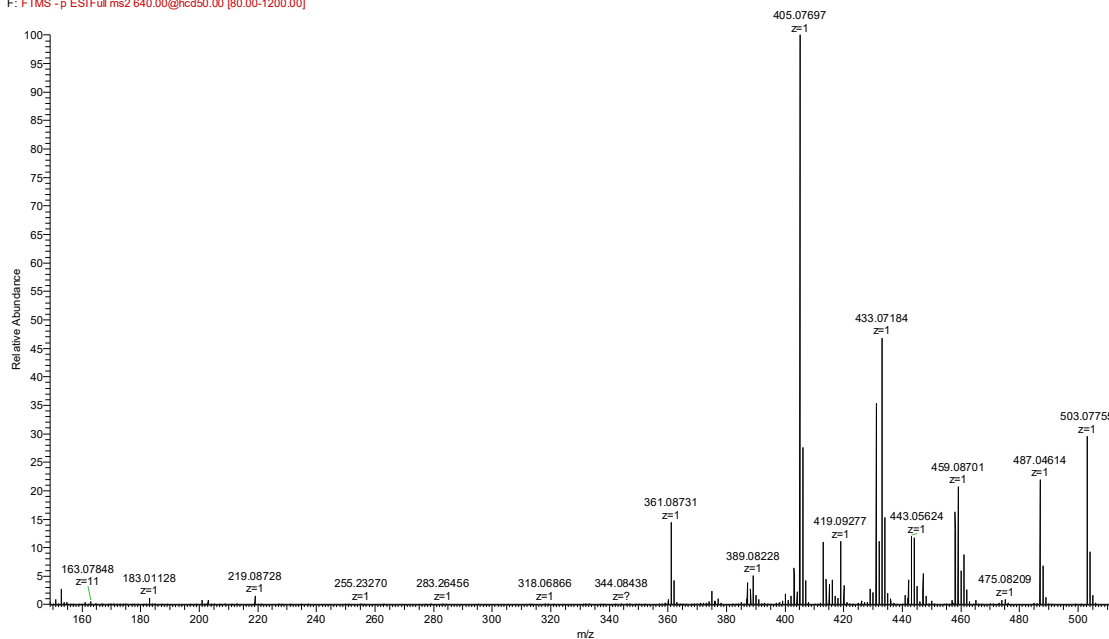
- TRUGER, T. JUNKER, G. SUIZDAK, Mark BRÖNSTRUP. *Topics in Current Chemistry: Modern Mass Spectroscopy*, pp. 1-302, 225. Springer-Verlag, Berlin, 2003.
- [41] STUMPF, Ursula. *Naše léčivé rostliny*. Praha: Ikar, 2013. ISBN 978-80-249-2207-2.
- [42] GÓRNICKA, Jadwiga. *Domácí přírodní lékárna: rádce pro zdraví*. Praha: Vašut nakladatelství, 2002. ISBN 80-7236-026-4.
- [43] JANČA, Jiří a Josef A. ZENTRICH [ilustrace Magdalena MARTÍNKOVÁ]. *Herbář léčivých rostlin*. Praha: Eminent, 2008. ISBN 9788072813797.
- [44] GREŠÍK, Valdemar. *Léčivé rostliny: jejich vlastnosti, účinky a použití*. Praha 1: Eminent, 2015. ISBN 978-80-7281-331-5.
- [45] PONCAROVÁ, Jana. Pěstuj zeleninu: Svatojánská bylina třezalka tečkovaná [online]. 2017 [cit. 2017-07-09]. Dostupné z: <http://pestujzeleninu.cz/svatojanska-bylina-trezalka-teckovana/>
- [46] Herbář: LUZAR, Petr. Třezalka tečkovaná - *Hypericum perforatum* L. [online]. 2011 [cit. 2017-07-09]. Dostupné z: <http://herbar.divokakosmetika.cz/herbar.php?bylina=223>
- [47] OLIVEIRA, A. I., C. PINHO, B. Sarmento, and A. C. DIAS. 2016. *Neuroprotective Activity of Hypericum perforatum and Its Major Components*. *Front Plant Sci* 7: 1004.
- [48] WOLFLE, U., G. SEELINGER, and C. M. SCHEMPP. 2014. *Topical application of St. John's wort (Hypericum perforatum L.)*. *Planta Med* 80: 109-20.
- [49] JENDŽELOVSKÁ, Zuzana, Rastislav JENDŽELOVSKÝ, Barbora KUČÁROVÁ a Peter FEDOROČKO. *Hypericin in the Light and in the Dark: Two Sides of the Same Coin*. *Frontiers in Plant Science* [online]. 2016, 7, - [cit. 2017-03-12]. DOI: 10.3389/fpls.2016.00560. ISSN 1664 - 462x. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00560/abstract>
- [50] KUBIN, A., F. WIERRANI, U. BURNER, G. Alth, and W. GRUNBERGER. 2005. *Hypericin-the facts about a controversial agent*. *Curr Pharm Des* 11: 233-53.
- [51] CHATTERJEE, S. S., S. K. BHATTACHARYA, M. WONNEMANN, A. Singer, and W. E. MULLER. 1998. *Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts*. *Life Sci* 63: 499-510.
- [52] TORRES-SALAZAR, D., J. JIANG, C. B. DIVITO, J. GARCIA-OLIVARES, and S. G. AMARA. 2015. *A Mutation in Transmembrane Domain 7 (TM7) of Excitatory Amino Acid Transporters Disrupts the Substrate-dependent Gating of the Intrinsic Anion Conductance and Drives the Channel into a Constitutively Open State*. *J Biol Chem* 290: 22977-90.
- [53] NAHRSTEDT, A. and V. BUTTERWECK. 1997. *Biologically active and other chemical constituents of the herb of Hypericum perforatum L.* *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl 2: 129-34.
- [54] BIBER, A., H. FISCHER, A. ROMER, and S. S. CHATTERJEE. 1998. *Oral bioavailability of hyperforin from hypericum extracts in rats and human volunteers*. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 1: 36-43.

- [55] SCHULZ, H. U., M. SCHURER, D. BASSLER, and D. WEISER. 2005. *Investigation of the bioavailability of hypericin, pseudohypericin, hyperforin and the flavonoids quercetin and isorhamnetin following single and multiple oral dosing of a hypericum extract containing tablet*. *Arzneimittelforschung* 55: 15-22.
- [56] LIEBES, L., Y. MAZUR, D. FREEMAN, D. LAVIE, G. LAVIE, N. KUDLER, S. MENDOZA, B. LEVIN, H. HOCHSTER, and D. MERUELO. 1991. *A method for the quantitation of hypericin, an antiviral agent, in biological fluids by high-performance liquid chromatography*. *Anal Biochem* 195: 77-85.
- [57] DENKE, A., H. SCHEMPP, D. WEISER, and E. F. ELSTNER. 2000. *Biochemical activities of extracts from Hypericum perforatum L. 5th communication: dopamine-beta-hydroxylase-product quantification by HPLC and inhibition by hypericins and flavonoids*. *Arzneimittelforschung* 50: 415-9.
- [58] SAKOWSKA, J., M. ANYZEWSKA, A. LOZAK, A. KOWALCZUK, and R. JABLONCZYNSKA. 2016. *Testing pharmaceutical release of active substances from medicinal products containing St. John's Wort*. *Acta Pol Pharm* 73: 395-401.
- [59] KUSARI, S., S. SEZGIN, K. NIGUTOVA, E. CELLAROVA, and M. SPITELLER. 2015. *Spatial chemo-profiling of hypericin and related phytochemicals in Hypericum species using MALDI-HRMS imaging*. *Anal Bioanal Chem* 407: 4779-91.
- [60] HOHMANN, M. S., R. D. CARDOSO, V. FATTORI, N. S. ARAKAWA, J. C. TOMAZ, N. P. LOPES, R. CASAGRANDE, and W. A. VERRI, Jr. 2015. *Hypericum perforatum Reduces Paracetamol-Induced Hepatotoxicity and Lethality in Mice by Modulating Inflammation and Oxidative Stress*. *Phytother Res* 29: 1097-101.
- [61] MUSZYNSKA, B., H. EKIERT, I. KWIECIEN, A. MASLANKA, R. ZODI, and L. BEERHUES. 2014. *Comparative analysis of therapeutically important indole compounds in in vitro cultures of Hypericum perforatum cultivars by HPLC and TLC analysis coupled with densitometric detection*. *Nat Prod Commun* 9: 1437-40.
- [62] de los REYES, G. C. and R. T. KODA. 2001. *Development of a simple, rapid and reproducible HPLC assay for the simultaneous determination of hypericins and stabilized hyperforin in commercial St. John's wort preparations*. *J Pharm Biomed Anal* 26: 959-65.
- [63] SCHEMPP, C. M., B. WINGHOFER, M. LANGHEINRICH, E. SCHOPF, and J. C. SIMON. 1999. *Hypericin levels in human serum and interstitial skin blister fluid after oral single-dose and steady-state administration of Hypericum perforatum extract (St. John's wort)*. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 12: 299-304.
- [64] CHANDRASEKERA, D. H., K. J. WELHAM, D. ASHTON, R. MIDDLETON, and M. HEINRICH. 2005. *Quantitative analysis of the major constituents of St John's wort with HPLC-ESI-MS*. *J Pharm Pharmacol* 57: 1645-52.
- [65] STAMENKOVIĆ, J., RADOJKOVIĆ, I., ĐORĐEVIĆ, A., JOVANOVIĆ, O., PETROVIĆ, G., STOJANOVIĆ, G. 2013. *Optimization of HPLC method for the isolation of Hypericum perforatum L. methanol extract*. *Biologica Nyssana*, 4 (1-2), 81-85.

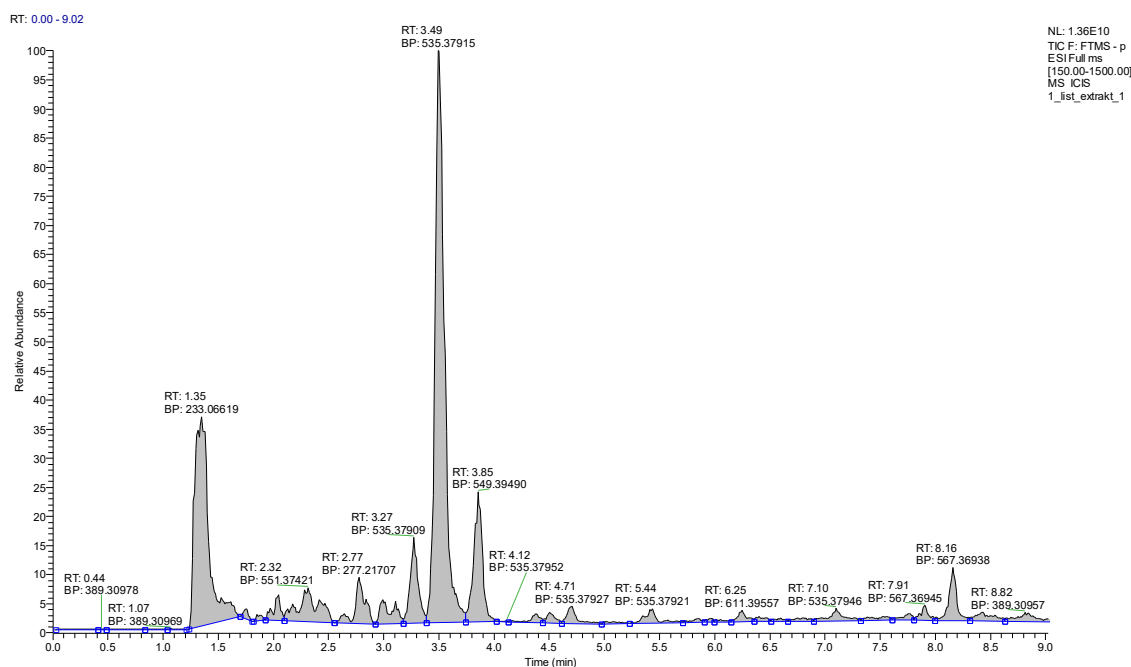
- [66] NUEVAS-PAZ, Lauro, Jorge MOLINA-TORRES, and Sylvia PRIETO-GONZÁLEZ. 2005. *Determination of hypericin in Hypericum species grown in Cuba*. Acta Farm Bonaerense 24: 89-90.
- [67] ERDELSKÁ, Olga a kol. *Atlas léčivých rostlin*. Bratislava: Příroda, 2008. ISBN 978-80-07-01528-9.
- [68] WYNN, Jeanne L. a Therese M. COTTON. *Spectroscopic Properties of Hypericin in Solution and at Surfaces*. The Journal of Physical Chemistry [online]. 1995, 99(12), 4317-4323 [cit. 2017-07-25]. DOI: 10.1021/j100012a063. ISSN 0022-3654. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100012a063>
- [69] ASPET: The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics: OBACH, Scott R. *Inhibition of Human Cytochrome P450 Enzymes by Constituents of St. John's Wort, an Herbal Preparation Used in the Treatment of Depression* [online]. 2000 [cit. 2017-01-23]. Dostupné z: <http://jpet.aspetjournals.org/content/294/1/88>
- [70] ChromaBLOGraphy: SCHWARTZ, N. *Fluorophenyl LC Phases* [online]. USA, 2017 [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <http://blog.restek.com/?p=33693>
- [71] MACHEREY-NAGEL: Chroma-News. *PFP phases – a complement with orthogonal selectivity* [online]. 2017 [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <http://www.mn-net.com/tabid/11743/default.aspx>
- [72] KORBELÁŘ, Jaroslav a Zdeněk ENDRIŠ. *Naše rostliny v lékařství*. 4. vydání. Praha 1: Avicenum, Zdravotnické nakladatelství, n. p., 1974. ISBN 08-006-74.
- [73] BALOUN, Jan a Luděk JAHODÁŘ. *Rostliny způsobující otravy a alergie*. Praha 1: Avicenum, Zdravotnické nakladatelství, n. p., 1989. ISBN 08-083-89.

Přílohy

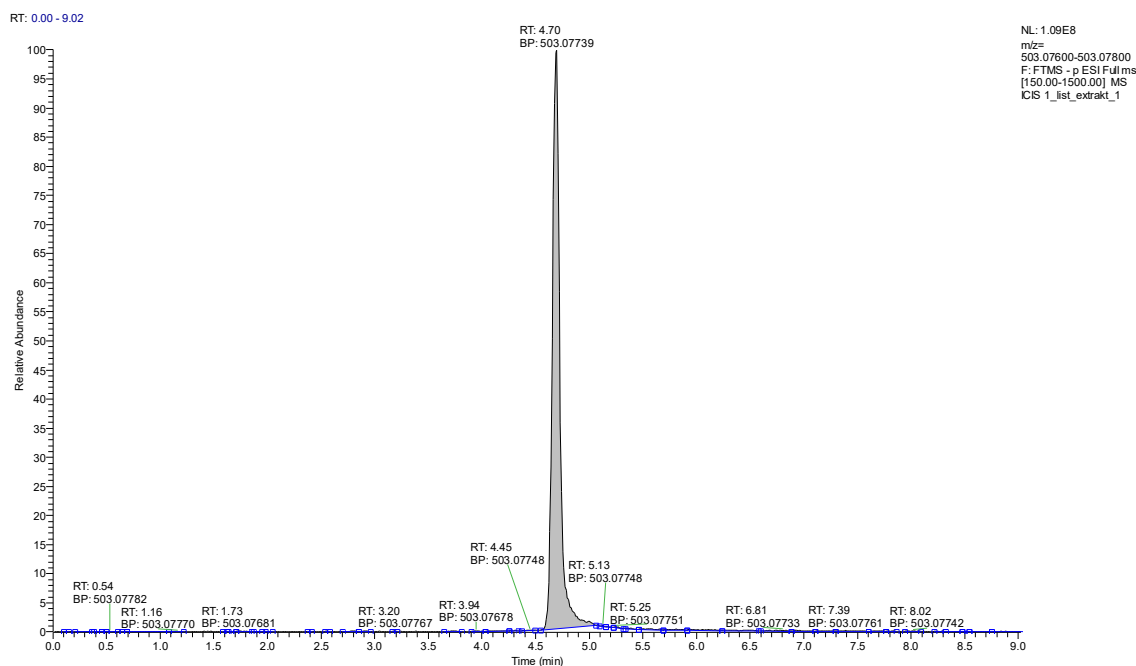
Hypericin_25ug_ml_1 #810 RT: 4.67 AV: 1 NL: 9.61E6
 F: FTMS -p ESI Full ms 2.640.00@hcd50.00 [80.00-1200.00]



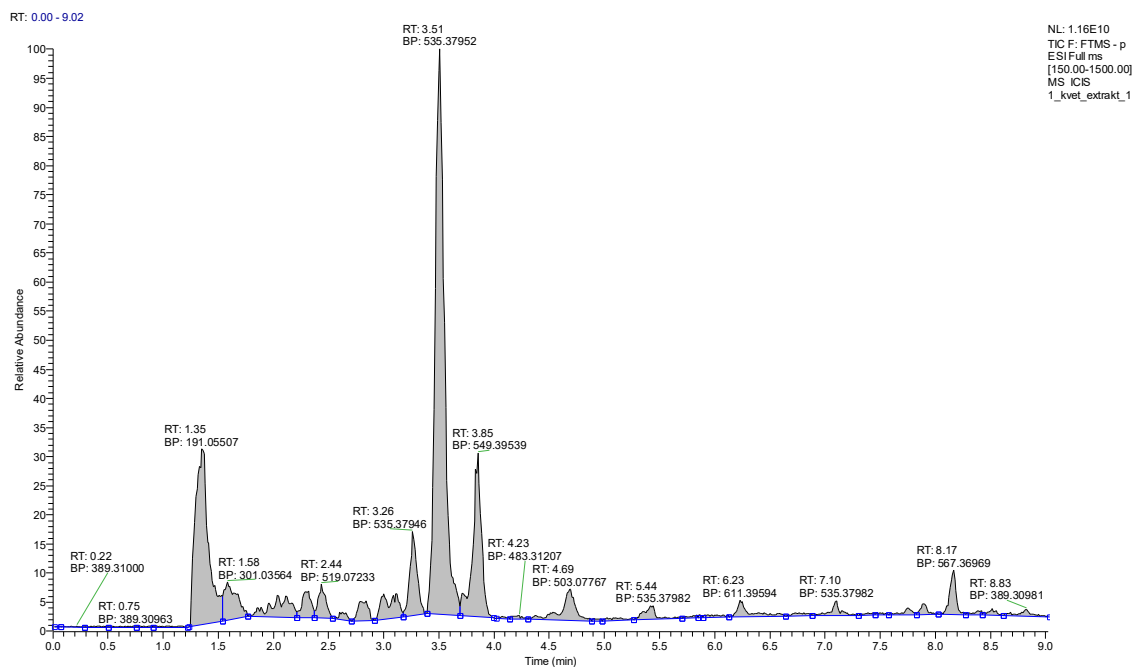
Obr. P1: Fragmentační HRMS spektrum hypericinu (NCE = 50).



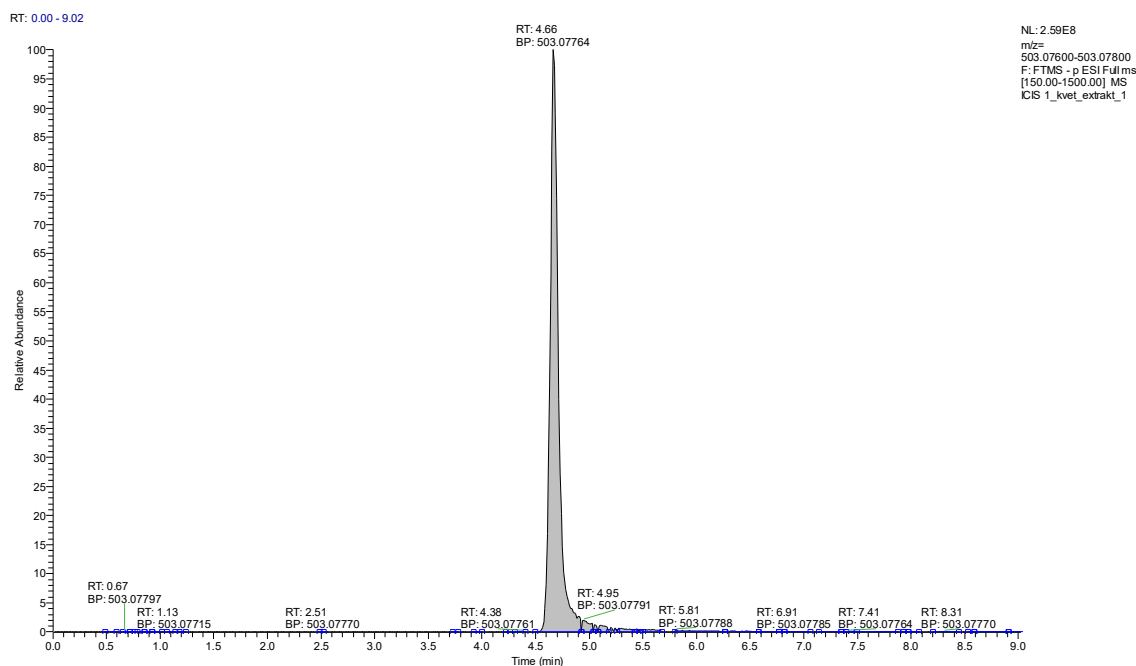
Obr. P2: Iontový chromatogram (FS) methanolvého extraktu rostlinné části listu z třezalky tečkované na koloně Kinetex C18.



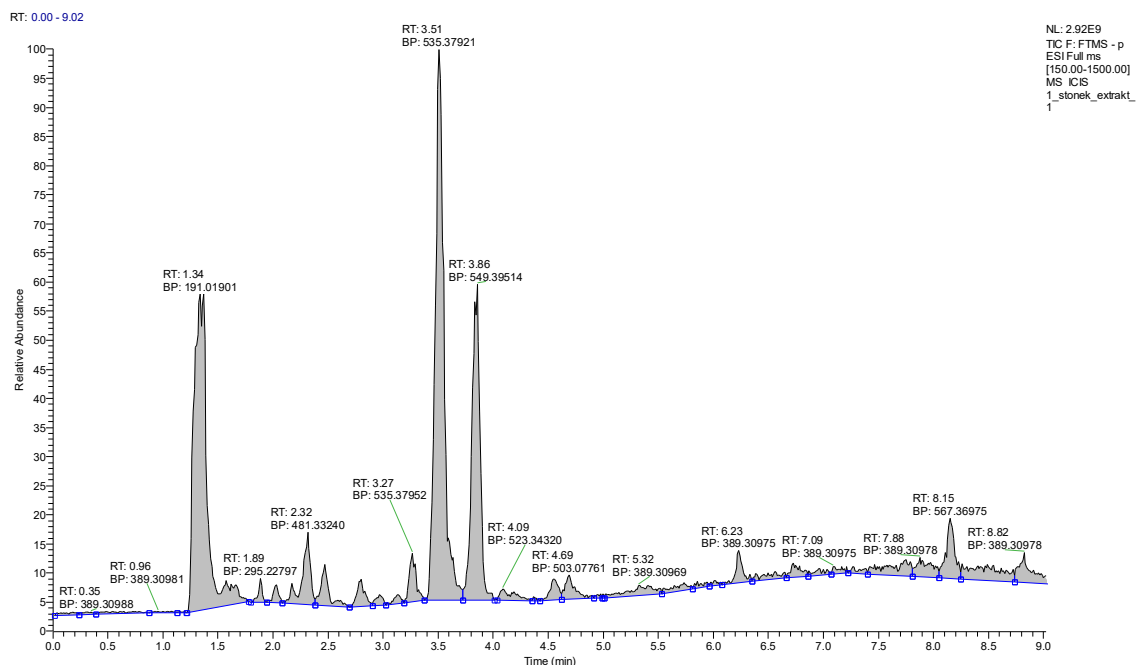
Obr. P3: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) hypericinu ($m/z = 503,077 - 503,078$) z methanolového extraktu rostlinné části listu třezalky tečkované na koloně Kinetex C18.



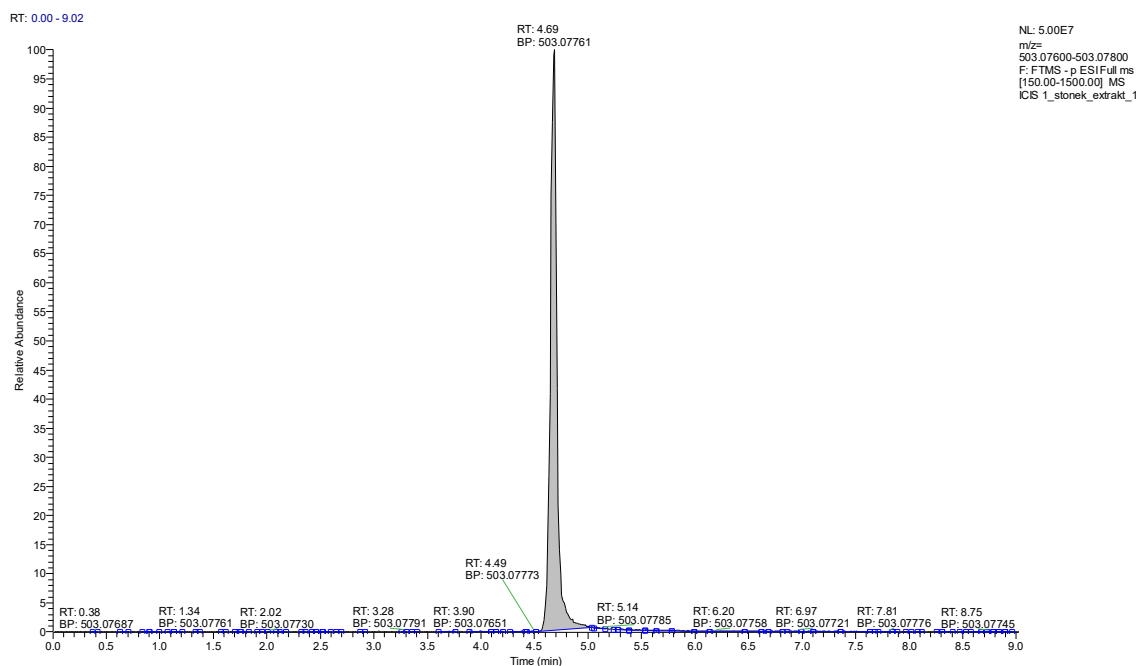
Obr. P4: Ionový chromatogram (FS) methanolového extraktu rostlinné části květu z třezalky tečkované na koloně Kinetex C18.



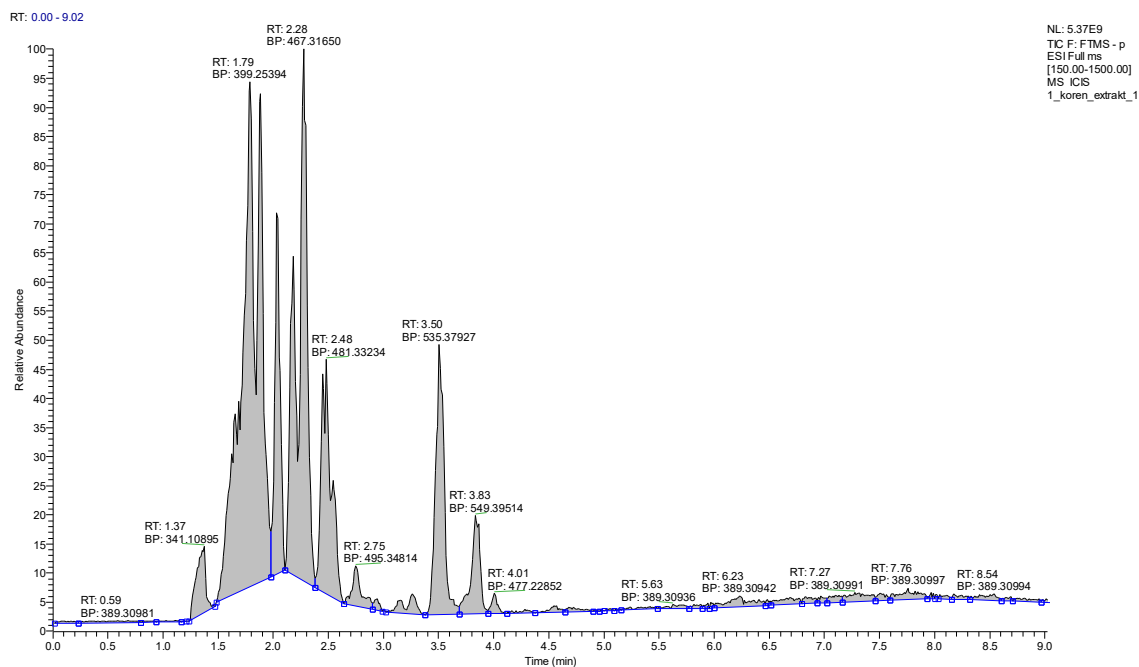
Obr. P5: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) hypericinu ($m/z = 503,077 - 503,078$) z methanového extraktu rostlinné části květu třezalky tečkové na koloně Kinetex C18.



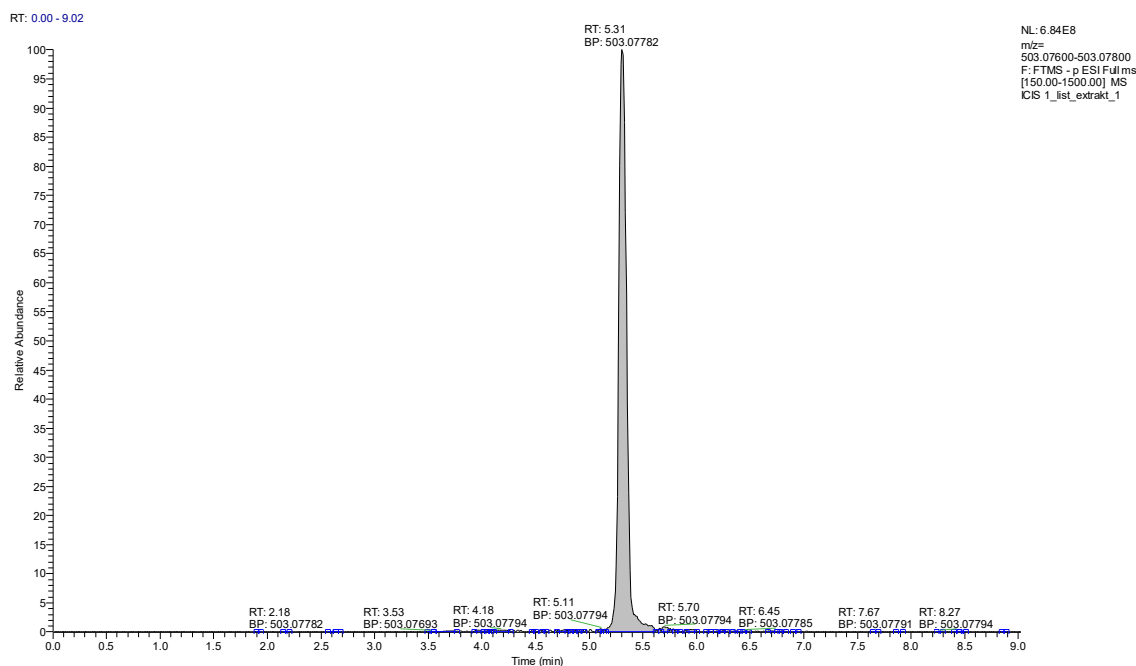
Obr. P6: Ionový chromatogram (FS) methanového extraktu rostlinné části nati z třezalky tečkové na koloně Kinetex C18.



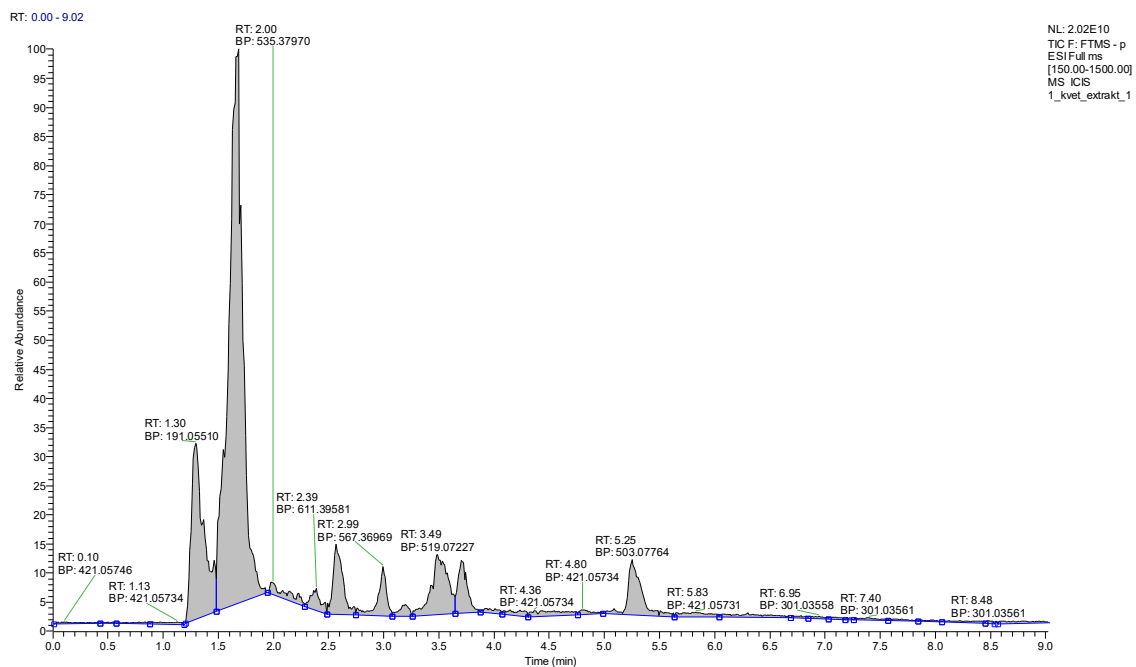
Obr. P7: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) hypericinu ($m/z = 503,077 - 503,078$) z methanového extraktu rostlinné části nati třezalky tečkové na koloně Kinetex C18.



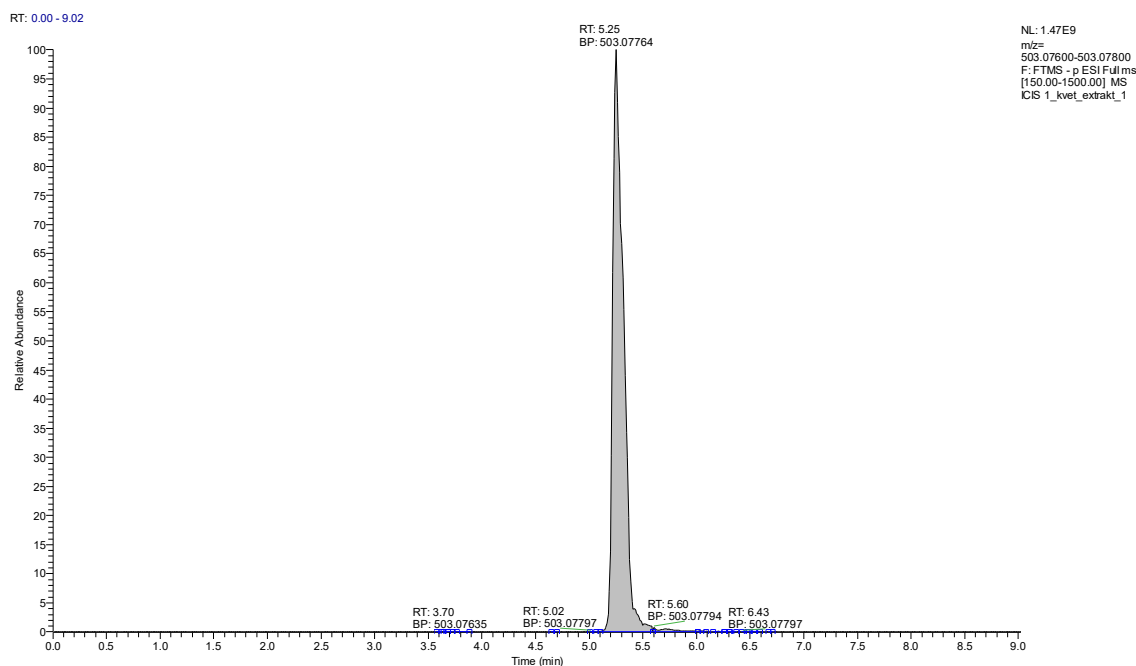
Obr. P8: Ionový chromatogram (FS) methanového extraktu rostlinné části kořene z třezalky tečkové na koloně Kinetex C18.



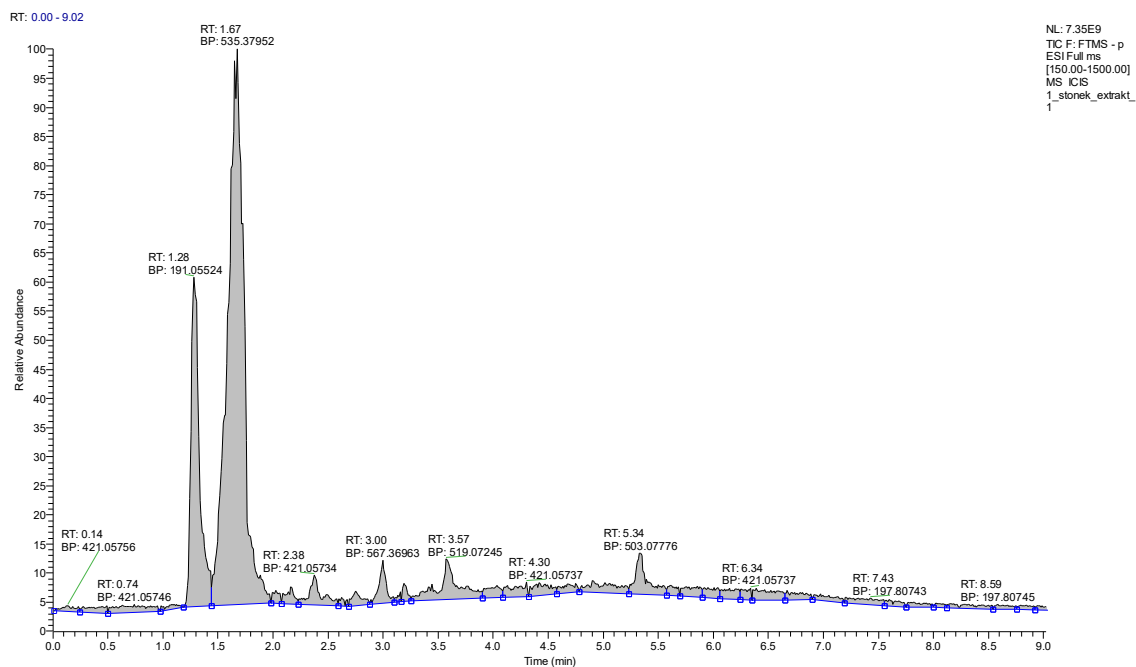
Obr. P11: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) hypericinu ($m/z = 503,077 - 503,078$) z methanového extraktu rostlinné části listu třezalky tečkované na koloně Kinetex PFP.



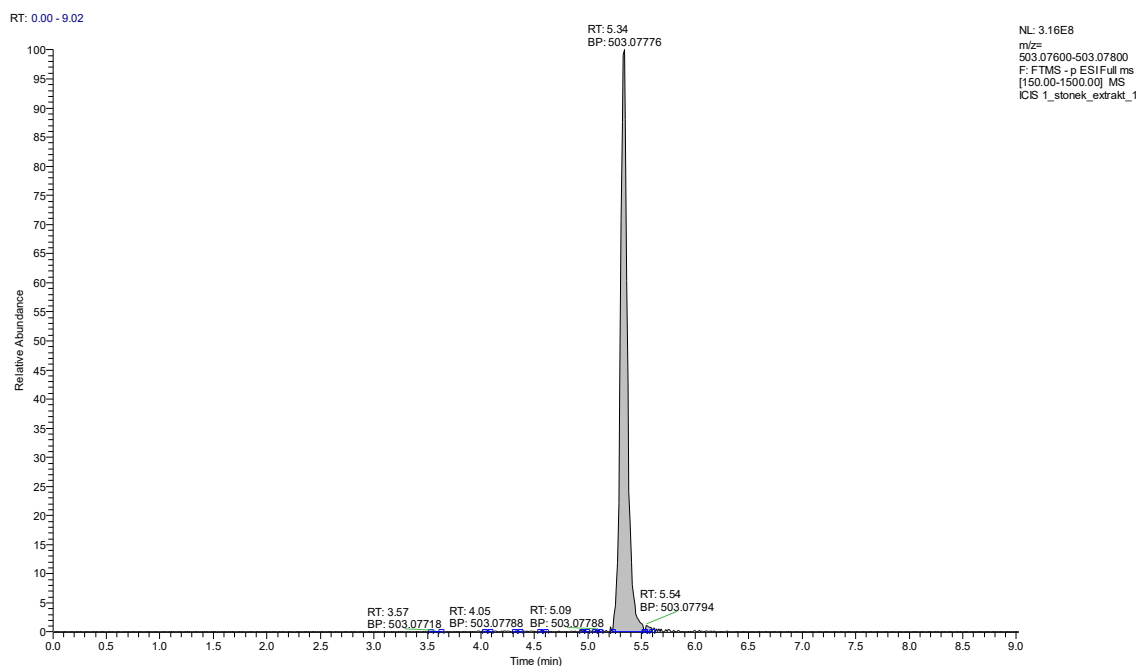
Obr. P12: Ionový chromatogram (FS) methanového extraktu rostlinné části květu z třezalky tečkované na koloně Kinetex PFP.



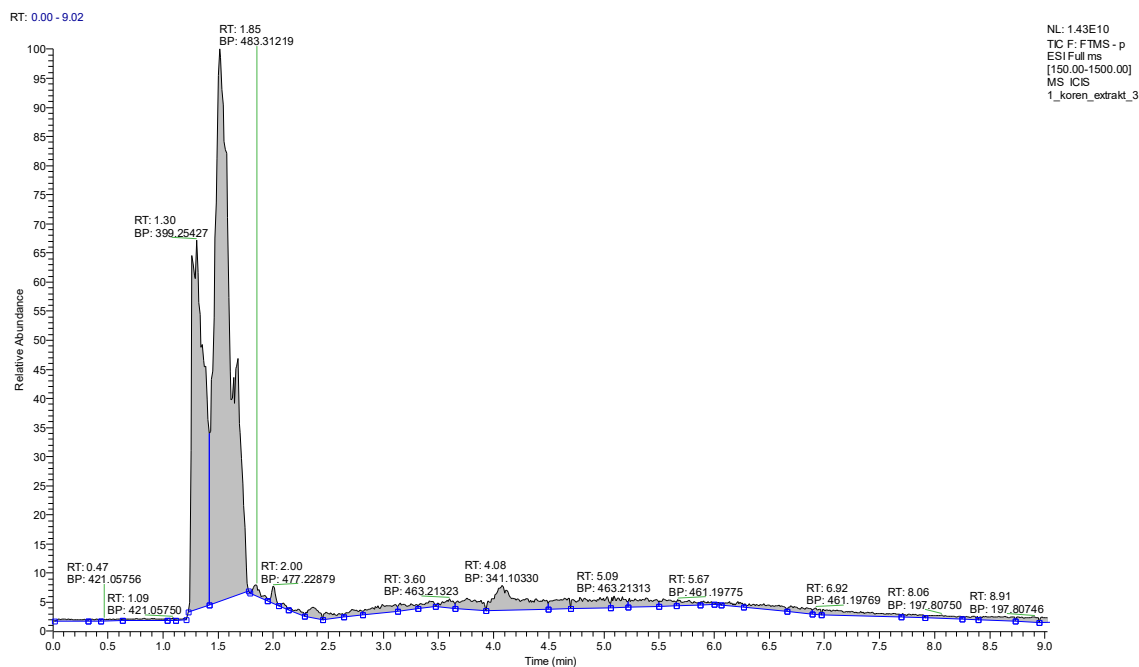
Obr. P13: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) hypericinu ($m/z = 503,077 - 503,078$) z methanolového extraktu rostlinné části květu třezalky tečkované na koloně Kinetex PFP.



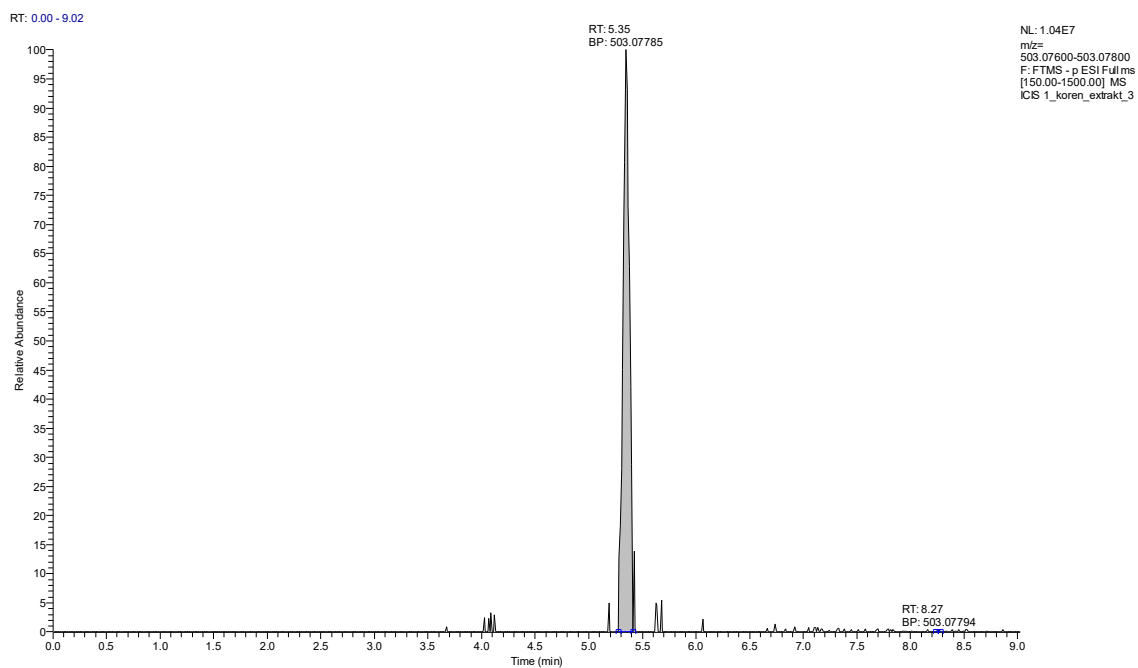
Obr. P14: Ionový chromatogram (FS) methanolového extraktu rostlinné části nati z třezalky tečkované na koloně Kinetex PFP.



Obr. P15: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) hypericinu ($m/z = 503,077 - 503,078$) z methanového extraktu rostlinné části nati třezalky tečkované na koloně Kinetex PFP.



Obr. P16: Ionový chromatogram (FS) methanového extraktu rostlinné části kořene z třezalky tečkované na koloně Kinetex PFP.



Obr. P17: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) hypericinu ($m/z = 503,077 - 503,078$) z methanolového extraktu rostlinné části kořene třezalky tečkované na koloně Kinetex PFP.