

STUDIUM VLIVU SACHAROSY A POLYETHYLENGLYKOLU NA PRODUKCI HYPERICINU A HYPERFORINU V ROSTLINÁCH *Hypericum perforatum* L. VYSOKO- ÚČINNNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAPHIÍ

MICHAL PAVLÍK^a, JAN VACEK^b, BOŘIVOJ
KLEJDUS^c a VLASTIMIL KUBÁŇ^c

^a Ústav přírodních léčiv, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Palackého 1–3, 612 42 Brno, ^b Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, Královopolská 135, 612 65 Brno, ^c Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
kuban@mendelu.cz

Došlo 22.5.06, přepracováno 6.11.06, přijato 5.1.07.

Klíčová slova: hypericin, hyperforin, chromatografie, HPLC, UV-Vis, třezalka tečkovaná, *Hypericum perforatum* L.

Úvod

Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum* L.) obsahuje spektrum biologicky aktivních látek, jako jsou naftodianthrony, florigluciny, flavonoidy, taniny, fenypropyly, xanthony a další¹. Většinou jde o sekundární metabolity, které vykazují stimulační nebo inhibiční účinek na fyziologické procesy. Toto zjištění vedlo v minulosti k využívání extraktů z *H. perforatum* v tradiční lidové medicíně. S rozvojem farmakologie a farmakochemických oborů byly účinné látky izolovány a začaly se využívat i v klasické humánní medicíně. Zároveň byl objasněn fyziologický účinek těchto látek na molekulární úrovni.

Farmakopreparáty připravené z extraktů *H. perforatum* se podávají při léčbě depresivních stavů a představují alternativu k syntetickým antidepresivům. Účinné látky obsažené v extraktech třezalky jsou schopny (i) obecně inhibovat metabolismus neurotransmiterů, (ii) modulovat citlivost neurotransmiterů a (iii) inhibovat synaptický transport mediátorů nervového signálu, jako je serotonin, noradrenalin a dopamin^{1,2}.

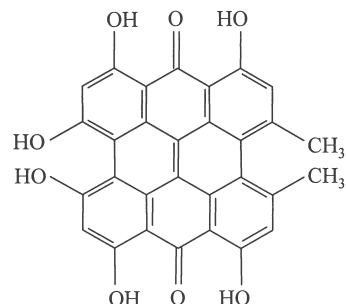
Předmětem našeho zájmu je hypericin – derivát naftodianthronu (obr. 1a) a hyperforin – derivát fluoroglucinu (obr. 1b). Obě látky jsou přítomny v extraktech *H. perforatum* a představují hlavní aktivní komponenty s antidepresivním účinkem. O biochemické podstatě antidepresivního účinku hypericinu a hyperforinu doposud není

příliš mnoho známo. Při vyšších dávkách hypericinu byla prokázána schopnost inhibice monoaminoxidas³. V literatuře je také popsána afinita hypericinu k σ -opioidním receptorům¹. Hyperforin je zastoupen v rostlinách třezalky ve vyšších koncentracích než hypericin. Má významný účinek na serotoninový, noradrenalinový, dopaminový a opioidní systém živočichů, včetně člověka. Mezi popsané mechanismy *in vitro* patří (i) antagonismus ke spasmogenním účinkům, (ii) antagonismus ke kontrakcím tenkého střeva řízeným serotoninem a (iii) inhibice transportu serotoninu³.

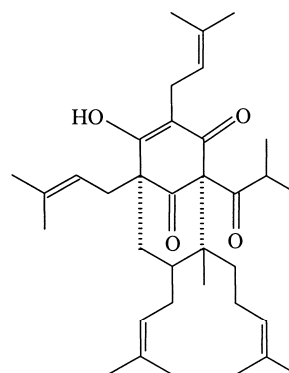
U 10 ze 13 klinických studií byl pozorován vyšší antidepresivní účinek u extraktu z třezalky ve srovnání s podaným placebem a v některých případech dokonce i vyšší než u antidepresiv Elavil, Prozac, Tofranil nebo Zoloft³. Ukazuje se, že extrakty z třezalky mohou plnit funkci účinného doplňku k běžně používaným léčivům depresivních stavů.

Cíle této práce jsou: (i) optimalizovat metodu kapalinové chromatografie s UV-Vis detekcí k rychlému a citlivému stanovení hypericinu a hyperforinu v prýtech *H. perforatum* a (ii) stimulovat rostliny pěstované *in vitro* ke zvýšené produkci obou látek účinkem sacharosy a polyethylenglykolu (HO-[CH₂-CH₂-O]_n-H) a poukázat tak na

a



b



Obr. 1. Strukturální vzorce (a) hypericinu a (b) hyperforinu

variabilní obsah hypericinu a hyperforinu v závislosti na podmínkách růstu rostlin třezalky.

Materiál a metody

Rostlinný materiál

K experimentům byly použity rostliny *Hypericum perforatum* L. var. Topas, vypěstované ze semen. Semena byla sesbírána v roce 2000 v Zahradě léčivých rostlin LF MU Brno. Semena byla promývána roztokem detergentu (Jar, Procter&Gamble – Rakona, Rakovník, Česká republika) ve zkumavkách po dobu 60 min. Po slití roztoku detergentu a opláchnutí destilovanou vodou byla semena desinfikována 15% roztokem Sava (obsah chlornanu sodného max. 5 %, Bochemie, Bohumín, Česká republika) po dobu 20 min. Semena byla následně desetkrát opláchnuta ve sterilní destilované vodě a očkovaná na kultivační půdu k naklíčení (13 dní). Veškeré operace byly prováděny v aseptickém boxu Fatran LF (Chirana, Brno, Česká republika).

Kultivační médium

V experimentech bylo použito komerčně dostupné 50% kultivační médium Murashige-Skoog (MS) (cit.⁴) o koncentraci 2,151 g dm⁻³ s doplňkem glycinu (2 mg dm⁻³), myo-inositolu (100 mg dm⁻³), nikotinové kyseliny (0,5 mg dm⁻³), hydrochloridu pyridoxinu (0,5 mg dm⁻³) a hydrochloridu thiaminu (0,1 mg dm⁻³), zpevněné Gelritem 3,0 g dm⁻³ (vše Duchefa, Haarlem, Nizozemí). Složky kultivačního média byly míchány na elektromagnetické míchače ve zvoleném množství destilované vody až do rozpuštění. Poté byly homogenním kultivačním médiem (75 ml) naplněny infúzní lahve (0,5 l), které byly následně uzavřeny alobalem. Kultivační médium a pracovní nástroje byly sterilizovány v autoklávu (typ AUT 26/2, Chirana, Brno, Česká republika) při teplotě 121 °C a přetlaku 110 kPa po dobu 20 min. Veškeré manipulace vyžadující sterilní prostředí byly prováděny v aseptickém boxu Fatran LF (Chirana, Brno, Česká republika).

Kultivační podmínky

Rostliny byly kultivovány ve sterilních podmínkách v kultivačním osvětlovacím boxu MIR Sanyo (Schoeller, Německo) při teplotě 22±4 °C a při světelné periodě 16/8 h (světlo/tma). Zdrojem světla byly zářivky Osram L36W/77 Fluora (Osram, München, Německo) s maximální intenzitou záření v rozmezí $\lambda = 400\text{--}500$ nm a 600–700 nm a méně výrazným maximem při $\lambda = 550$ nm. Tyto zářivky simulují přirozené světlo se současným posílením vlnových délek v červené a modré oblasti.

Po naklíčení byly malé rostlinky přeneseny do infúzních lahví na udržovací půdu (MS 50 %, vitamíny 100 %, sacharosa 10 g dm⁻³, gibberelová kyselina 75 $\mu\text{g dm}^{-3}$ a Gelrite

0,25 %) a pěstovány 15 dnů do velikosti asi 3 až 4 cm v kultivačním osvětlovacím boxu.

Kultivace rostlin na médiu s přidavkem sacharosu (p.a., Pliva-Lachema, Brno, Česká republika) v koncentracích 10, 20 a 30 g dm⁻³ a polyethylenglykolu 6000 (PEG, Fluka, Buchs, Švýcarsko) v koncentracích 1,25; 2,5; 5; 10 a 15 g dm⁻³ probíhala 21 dní za výše uvedených podmínek. Uvedeným koncentracím sacharosu a PEG byly vystaveny rostliny pěstované na udržovací půdě.

Odběr vzorků

Po ukončení kultivace byla provedena fotodokumentace (Olympus C-4040 ZOOM, Olympus, Tokyo, Japan). Celé prýty byly vždy odebrány ze všech rostlin v jedné infúzní lahvi. Od každé varianty byly odebrány tři vzorky. Vzorky byly zváženy a ihned vloženy do plastových zkumavek, zmrazeny kapalným dusíkem a uchovávány v mrazicím boxu při konstantní teplotě –80 °C. Před stanovením obsahu hypericinu a hyperforinu metodou HPLC byly všechny vzorky lyofilizovány v lyofilizátoru Christ Alpha 1-2 B (Braun Biotech Internat., Osterode, Německo) a homogenizovány mletím v kapalném dusíku (Vibrom 2S, Jebavý, Třeběchovice p. O., Česká republika). Gravimetricky byl stanoven obsah vody v zařízení na stanovení vlhkosti MA 30 (Sartorius, Goettingen, Německo).

Homogenizované vzorky (20 mg) byly extrahovány 40 ml 80% (v/v) ethanolu (teplotní program: 1. stupeň: teplota chladicího/ohřívacího bloku 150 °C po 30 min, ochlazení chladicího/ohřívacího bloku na 30 °C po 5 min; 2. stupeň: teplota chladicího/ohřívacího bloku 140 °C po 30 min, ochlazení chladicího/ohřívacího bloku na 30 °C na 5 min) v modifikovaném Soxhletě přístroji “fex Ika Werke 50“ (IKA-Werke, Staufen, Německo). Před nástřikem vzorku do HPLC systému byl získaný extrakt filtrován nylonovým membránovým filtrem (0,45 μm , 13 mm průměr, Alltech Associates, Doerfield, USA).

Chemikálie pro analýzu

Acetonitril (ACN) pro HPLC a octan amonný (AcNH₄) byly dodány firmou Merck (Darmstadt, Německo). Hypericin, hyperforin a další chemikálie ACS (American Chemical Standard) čistoty byly od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Zásobní roztoky hypericinu (40 $\mu\text{g dm}^{-3}$) a hyperforinu (100 $\mu\text{g dm}^{-3}$) v methanolu byly použity pro optimalizaci a kalibraci metody a byly uchovávány ve tmě při 4 °C. Všechny roztoky použité pro HPLC byly filtrovány 0,45 μm teflonovými membránovými filtry (MetaChem, Torrance, USA).

Chromatografie

HP 1100 chromatografický systém (Hewlett-Packard, Waldbronn, Německo) vybavený vakuovým odplynovacím modulem (G1322A), pumpami (G1312A), automatic-

kým dávkovačem vzorků (G1313A), termostatem kolon (G1316A) a UV-Vis detektorem s diodovým polem (G1315A) byl řízen programem ChemStation (Rev. A07.01). Hypericin a hyperforin byly separovány lineární gradientovou elucí na koloně s reverzní fází Zorbax SB-CN (75 mm × 4,6 mm, velikost částic 3,5 μm, Agilent, Palo Alto, USA) mobilní fází acetonitril a 0,01 mol dm⁻³ octan amonný (% v/v: 0 min 50/50, 5 min 100/0, 8 min 100/0, 10 min 50/50) při průtokové rychlosti mobilní fáze 0,8 ml min⁻¹ a teplotě termostatu kolon 35 °C.

Výsledky a diskuse

Chromatografické stanovení hypericinu a hyperforinu

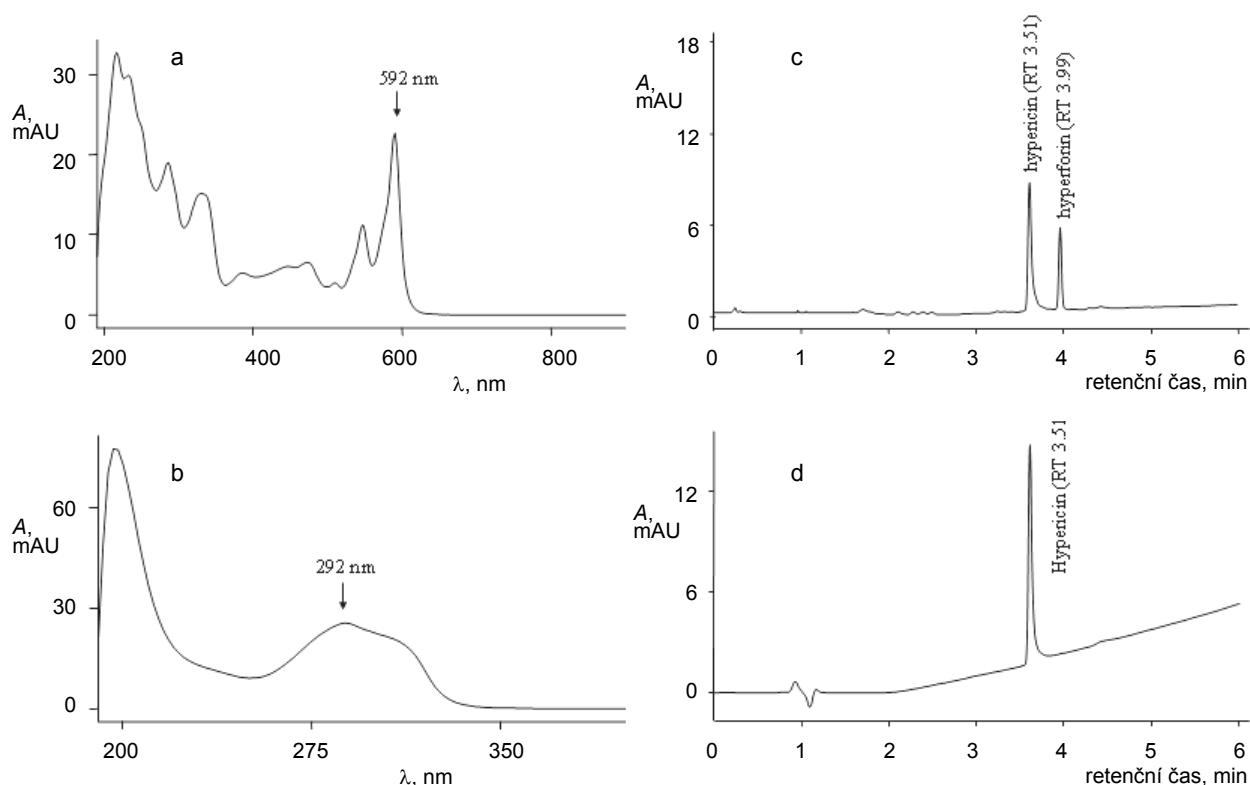
Extrakce hypericinu a hyperforinu z lyofilizovaných vzorků rostlinného materiálu byla prováděna 80% ethanol v modifikovaném Soxhletově přístroji. Extrahovat lze i jinými technikami, např. v destilační aparatuře se zpětným chladičem, ultrazvukem nebo komerčně dostupnými extraktory^{4,5}. Vzorky po extrakci nebo jiné manipulaci je vhodné ihned podrobit analýze, jelikož časem mohou obě

látky podléhat degradaci nebo oxidaci, především následkem extrémních hodnot pH a vysokých teplot⁵.

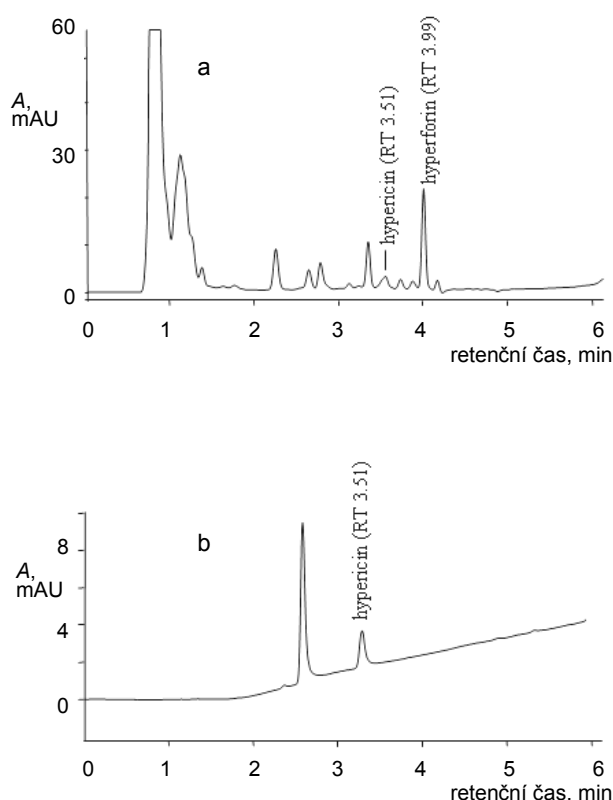
Vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s UV-Vis spektrofotometrickým⁶, fluorescenčním⁷, hmotnostním^{5,8} nebo elektrochemickým⁹ detektorem patří vedle klasické spektrofotometrie k nejrozšířenějším metodám pro stanovení hypericinu a hyperforinu. Pro separaci hypericinu z extraktů *H. perforatum* je možné využít izokratickou eluci¹⁰. Při gradientové eluci se obvykle používá jako nepolární organické rozpouštědlo acetonitril v kombinaci s vodnou fází obsahující slabé kyseliny (octová kyselina, trifluorooctová kyselina), jejich sole nebo směsi slabé kyseliny a její soli^{5,7,11}.

HPLC s detektorem s diodovým polem (DAD) byla použita pro stanovení hypericinu, hyperforinu a řady dalších komponent extraktu z *H. perforatum* při vlnové délce 270 a 590 nm (cit.¹¹). Kromě hypericinu (retenční čas (RT): 49,9 min) a hyperforinu (RT: 35,9 min) bylo možné při 270 nm stanovit pseudohypericin, kvercetin, rutin, hyperosid a další. Bauer a spol.¹⁰ použili kolony s reverzní fází umožňující separaci s retenčním časem 3,8 min pro hypericin a 6,8 min pro hyperforin.

V našem případě jsme pro rychlé (chromatografie s retenčními časy do 4 min) a citlivé stanovení hypericinu a hyperforinu využili metodou HPLC-UV-Vis DAD s gra-



Obr. 2. Absorpční spektra (a) hypericinu, (b) hyperforinu a chromatogram směsi hypericinu a hyperforinu snímáný UV-vis detektorem při vlnové délce 292 nm (c) a 592 nm (d); koncentrace hypericinu a hyperforinu 20 ng/nástrík, chromatografické podmínky viz kapitola „Chromatografie“



Obr. 3. Chromatogram hypericinu a hyperforinu reálných vzorků po Soxhletově extrakci při (a) 292 a (b) 592 nm; chromatografické podmínky viz kapitolu „Chromatografie“

dientovou elucí acetonitrilem a 0,01 mol dm^{-3} octanem amonným s detekcí při 592 nm pro hypericin a při 292 nm pro hyperforin (obr. 2a,b). Za daných experimentálních podmínek (viz výše) byly při koncentraci 20 ng hypericinu a hyperforinu na nástřik (5 μl) a při vlnové délce 292 nm absorpčního maxima hyperforinu (obr. 2b) detegovány dva dobře vyvinuté chromatografické píky (obr. 2c) v retenčních časech 3,51 a 3,99 min, neboť při této vlnové délce absorbuje i hypericin (obr. 2a). Obě látky tak lze analyzovat současně, nicméně vyšších signálů u hypericinu se dá dosáhnout sledováním absorbance při 592 nm (obr. 2d). Chromatogramy extraktů *H. perforatum* získané při různých vlnových délkách detekce jsou znázorněny na obr. 3.

Kalibrační závislosti byly lineární v koncentračním rozsahu 20–200 ng/nástřik (5 μl) hypericinu a hyperforinu s korelačními koeficienty $R^2 > 0,999$. Meze detekce (LOD pro 3 S/N kritérium) byly 90 pg/nástřik pro hypericin při 592 nm a 270 pg/nástřik pro hyperforin detegovaný při 292 nm.

Vliv sacharosu a PEG na morfologii a vzhled *H. perforatum*

Rostliny *H. perforatum* byly pěstovány na 50% MS kultivačním médiu po dobu 15 dnů. Získané semenáčky byly přeneseny do média s různými přídávky sacharosu a PEG. Po 21 dnech kultivace byly sledovány morfologické změny, obsah vody a koncentrace hypericinu a hyperforinu v prýtech experimentálních rostlin.

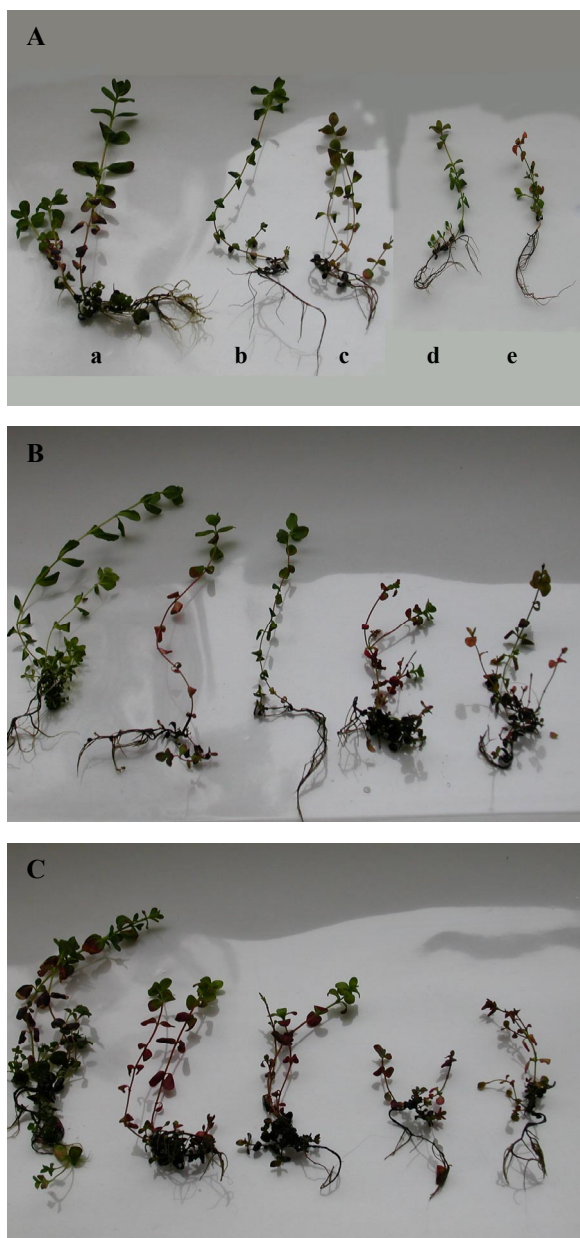
Pro sacharosu byly použity koncentrace 10, 20 a 30 g dm^{-3} kultivačního média. S rostoucí koncentrací sacharosu v médiu se zřetelně snižoval vzrůst a počet pater, zkracovala se internodia, a objevilo se červení listů a stonků a nepříliš zřetelné zmenšování listové plochy (obr. 4). Červení listů se poprvé objevovalo při koncentraci sacharosu 20 g dm^{-3} . I zde však bylo málo zřetelné a objevovalo se pouze v nejspodnějších částech rostlin. Lodyhy byly v dolní části narůžovělé. Při koncentraci sacharosu 30 g dm^{-3} bylo červené zbarvení rostlin již zřetelnější (někde až rudé) a zasahovalo místy i do vyšších částí rostlin.

Červení listů a stonků je pravděpodobně způsobeno hromaděním anthokyanů v pletivech. Jde o červená, modrá nebo fialová barviva, která jsou rozpustná ve vodě a částečně se podílejí na zbarvení květů a plodů a způsobují zbarvení listů a stonků. Pomáhají rostlině se vyrovnat se stresovými podmínkami vnějšího prostředí (syntéza anthokyanů se při osmotickém stresu zvyšuje). Patrně také snižují vodní potenciál v listech, čímž se zvyšuje příjem vody kořeny a omezuje se ztráta vody transpirací v listech¹².

V závislosti na množství PEG v médiu je u variant s koncentrací sacharosu 10 g dm^{-3} snižený dlouhý růst a počet pater. Některé části stonků i některé listy nekrotizují a červenají. Červení prakticky chybí při nejnižších koncentracích PEG (1,25 g dm^{-3}) a začíná se objevovat teprve při vyšších koncentracích PEG (2,5 a 5 g dm^{-3}). Se vzrůstající koncentrací PEG přibývá i nekroz. Mnohé listy jsou podélně tmavě žíhané. Kořeny jsou ve srovnání s kořeny kontrolních rostlin tenčí.

U variant s koncentrací sacharosu 20 g dm^{-3} se také redukuje dlouhý růst v závislosti na vzrůstající koncentraci PEG. Klesá rovněž počet pater a zmenšuje se listová čepel. Při koncentraci PEG 1,25 g dm^{-3} se již místy začíná objevovat červení stonků a listů – hlavně v dolních partiích rostliny. Se stoupající koncentrací PEG pak červení postupuje i do vyšších částí. Míra nekrotizace rovněž narůstá s koncentrací PEG. Kořeny jsou silnější než kořeny rostlin pěstovaných při koncentraci sacharosu 10 g dm^{-3} .

Stejně jako v předchozích případech, i u variant s koncentrací sacharosu 30 g dm^{-3} se v závislosti na rostoucí koncentraci PEG snižuje vzrůst, klesá počet pater a zmenšuje se listová plocha. Červení i nekrozy stonků a listů přibývá v závislosti na množství PEG. Celkově je červení nejzřetelnější ve srovnání s variantami s množstvím sacharosu 10 a 20 g dm^{-3} . Tloušťka kořenů je podobná jako u rostlin pěstovaných při koncentraci sacharosu 20 g dm^{-3} .



Obr. 4. Rostliny třezalky tečkované (*Hypericum perforatum* L.) po 21 dnech pěstování na MS médiu s (A) 10, (B) 20 (C) 30 g dm⁻³ sacharosu a různými koncentracemi PEG; zleva: 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 15 g dm⁻³

Souhrnně lze konstatovat, že míra červenání a nekrotizace se zvyšuje s rostoucí koncentrací PEG (snižuje se dlouhivý růst a zmenšuje se velikost listové čepele). U variant se stejnou koncentrací PEG jsou pak tyto projevy výraznější v závislosti na zvyšující se koncentraci sacharosu. Všeobecně se červenání listů a stonků objevuje při nižších koncentracích sacharosu a PEG než nekrózy listů a stonků (v závislosti na vzrůstající koncentraci sa-

charosu a PEG rostlinné části nejprve zčervenejí a potom teprve nekrotizují – viz obr. 4).

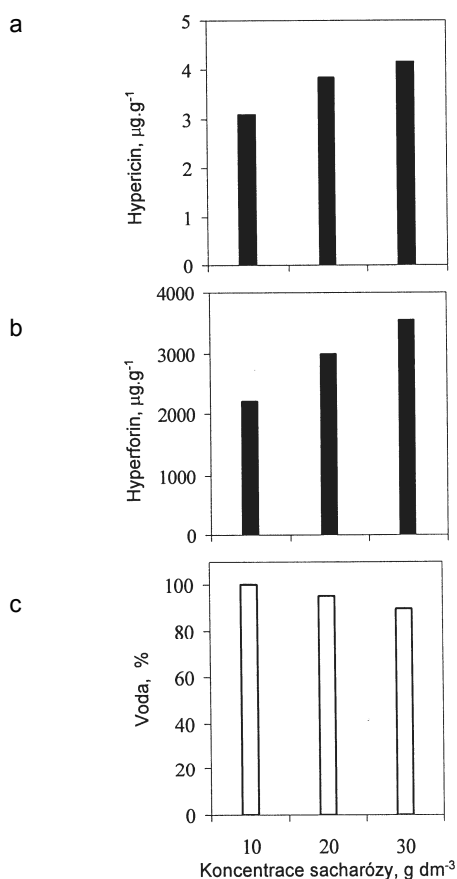
Vliv sacharosu a PEG na produkci hypericinu a hyperforinu

Přítomnost hypericinu a hyperforinu je u *H. perforatum* spojována s reakcí rostliny na abiotický stres a napadení patogenem. Rostliny třezalky je možné k produkci hypericinu a hyperforinu stimulovat aplikací chemických (jasmonová kyselina a methyl-jasmonát) i biotických (*Colletotrichum gloeosporioides*) stimulatorů^{13,14}. Hypericin a hyperforin, který rostliny produkují, je toxický pro celou řadu patogenů. Ze současných poznatků vyplývá, že přítomnost stresového faktoru může koncentraci hypericinu a hyperforinu v rostlinných buňkách výrazně ovlivnit.

U *H. perforatum* byl studován vliv chemických stimulatorů na produkci hypericinu, pseudohypericinu a hyperforinu po indukci různými koncentracemi (0–200 μmol dm⁻³) methyl-jasmonátu a salicylové kyseliny. Obě látky, v závislosti na koncentraci, pozitivně ovlivňují koncentraci hypericinu a hyperforinu v mladých rostlinách třezalky¹³. Kromě chemických stimulatorů nebo látek vyvolávajících stres ovlivňuje koncentraci hypericinu a hyperforinu také biotický stres. Ten může být způsoben různými patogeny nebo herbivorními škůdci^{13,15}.

V našich experimentech jsme studovali vliv jednoduchého cukru (sacharosu) a polymeru (polyethylenglykolu) na produkci hypericinu a hyperforinu. Koncentrace hypericinu a hyperforinu byla analyzována po 21 dnech kultivace. Se zvyšující se koncentrací sacharosu (10, 20 a 30 g dm⁻³) v kultivačním médiu se zvyšuje koncentrace hypericinu a hyperforinu v pletivu *H. perforatum*. U hypericinu byl pozorován nárůst koncentrace v pletivech třezalky ze 3 na 4 μg g⁻¹ (obr. 5a). Ve srovnání s naměřenými koncentracemi hypericinu byly u hyperforinu stanoveny koncentrace tisícinásobně vyšší. Rozdíl v obsahu hyperforinu u rostlin, které byly pěstovány v MS médiu s obsahem sacharosu 10 a 30 μg dm⁻³, činil cca 1500 μg g⁻¹ (obr. 5b). Se zvyšující se koncentrací sacharosu klesal obsah vody v pletivech kultivovaných rostlin (obr. 5c). Cukry (primárně sacharosa v koncentraci 20 g dm⁻³) byly součástí MS média pro pěstování třezalky¹³. Pro pěstování *Hypericum androsaemum* L. byla použita¹⁶ koncentrace sacharosu 30 g dm⁻³. Naše výsledky poukazují na skutečnost, že nebude možné srovnávat naměřené hodnoty obsahů hypericinu a hyperforinu u experimentů, ve kterých nebyla použita stejná koncentrace sacharosu v kultivačním médiu.

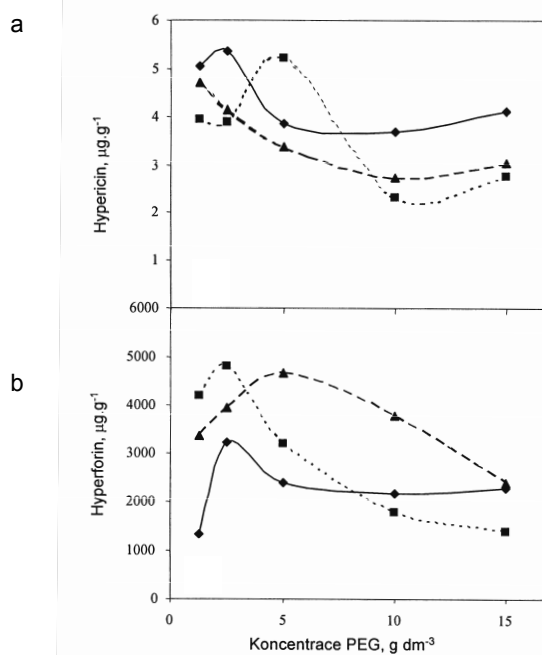
Dále byl studován vliv přídavku PEG (1,25; 2,5; 5; 10 a 15 g dm⁻³) k rostlinám, u kterých byla přítomna v kultivačním médiu sacharosa v koncentracích 10, 20 a 30 g dm⁻³. PEG má významný vliv na produkci hypericinu a hyperforinu, a to především v koncentračním rozsahu 2,5 až 5 g dm⁻³ a více (viz obr. 6). Jak u hypericinu, tak i u hyperforinu vykazovaly závislosti jejich obsahu na



Obr. 5. Vliv sacharózy na produkci (a) hypericin, (b) hyperforinu v sušině a (c) obsah vody (w %) v prýtech *H. perforatum* po 21 dnech pěstování; počet opakování $n = 3$

koncentraci PEG maxima při aplikaci 2,5 nebo 5 g dm⁻³ PEG. Z výsledku vyplývá, že zvýšení produkce hypericin a hyperforinu lze dosáhnout přidávkem nižších koncentrací PEG. Při vyšších koncentracích PEG se koncentrace obou látek v rostlinách *H. perforatum* snižuje nebo statisticky významně nemění. Obsah vody se v prýtech *H. perforatum* snižoval se zvyšující se koncentrací PEG v kultivačním médiu, podobně jako v případě samotné sacharózy. Tyto výsledky jsou v souladu s morfologickými změnami u rostlin *H. perforatum*.

Pokud by byl obsah hypericin nebo hyperforinu sledován během několikaměsíčního pěstování (popř. u rostlin rostoucích v přírodních podmínkách), je třeba zohlednit vliv sezónních změn v koncentraci obou látek. U hypericin bylo zjištěno, že se jeho koncentrace v průběhu roku prokazatelně mění¹⁷.



Obr. 6. Vliv polyethylenglykolu na produkci (a) hypericin, (b) hyperforinu při různých koncentracích sacharózy; ♦ 10 g dm⁻³, ■ 20 g dm⁻³, ▲ 30 g dm⁻³ v kultivačním médiu po 21 dnech pěstování; počet opakování $n = 3$

Závěr

Postupy převzaté z tradiční medicíny mohou sloužit jako doplněk klasické medikamentózní léčby u celé řady onemocnění. Zajímavé efekty byly zjištěny v klinických studiích kontrolovaných placebem¹⁸, např. u preparátů z jinanu dvojlaločného (*Ginkgo biloba*) a náprstníku (*Digitalis*). V problematice využití *H. perforatum* ve fyto-medicině se ve větší míře výzkumné zájmy orientují ke studiu hyperforinu než hypericin, jelikož hyperforin vykazuje výrazně vyšší účinek při potlačování depresivních symptomů než hypericin.

Znalosti o vlivech vnějších faktorů na produkci hypericin a hyperforinu u *H. perforatum* jsou důležité pro standardizaci farmakopreparátů. Nové a snadno aplikovatelné metody analýzy farmaceuticky využívaných látek jsou velmi významné, jelikož většina účinných látek izolovaných z výše uvedených rostlin vykazuje kromě léčebného efektu i toxický účinek, popř. se léčebný efekt dostavuje pouze při určité koncentraci účinné látky v preparátu.

Námi dosažené výsledky poukazují na variabilitu koncentrace hypericin a hyperforinu v závislosti na koncentraci sacharózy a PEG, kterým byly rostliny *H. perforatum* vystaveny v průběhu pěstování. Získané poznatky

bude možné využít v technologii pěstování *H. perforatum* pro farmaceutické účely a k detekci nízkých koncentrací hypericinů a hyperforinů.

LITERATURA

- Greeson J. M., Sanford B., Monti D. A.: *Psychopharm.* 153, 402 (2001).
- Muller W. E.: *Pharmacol. Res.* 47, 101 (2003).
- Chatterjee S. S., Bhattacharya S. K., Wonnemann M., Singer A., Muller W. E.: *Life Sci.* 63, 499 (1998).
- Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962).
- Fuzzati N., Gabetta B., Strepponi I., Villa F.: *J. Chromatogr., A* 926, 187 (2001).
- Štěrbová D., Klejdus B., Kramářová E., Kubáň V.: *Chem. Listy* 96, 202 (2002).
- Draves A. H., Walker S. E.: *J. Chromatogr., B* 749, 57 (2000).
- Riedel K. D., Rieger K., Martin-Facklam M., Mikus G., Haefeli W. E., Burhenne J.: *J. Chromatogr. B* 813, 27 (2004).
- Likussar W., Rueckert U., Ortner A.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 23, S64 (2004).
- Bauer S., Stormer E., Graubaum H. J., Roots I.: *J. Chromatogr., B* 765, 29 (2001).
- Li W. K., Fitzloff J. F.: *J. Chromatogr., B* 765, 99 (2001).
- Chalker-Scott L.: *Photochem. Photobiol.* 70, 1 (1999).
- Sirvent T. M., Gibson D. M.: *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 60, 311 (2002).
- Walker T. S., Bais H. P., Vivanco J. M.: *Phytochemistry* 60, 289 (2002).
- Sirvent T. M., Krasnoff S. B., Gibson D. M.: *J. Chem. Ecol.* 29, 2667 (2003).
- Guedes A. P., Amorim L. R., Vicente A. M. S., Ramos G., Fernandes-Ferreira M.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 1399 (2003).
- Southwell I. A., Bourke C. A.: *Phytochemistry* 56, 437 (2001).
- Goldman P.: *Ann. Intern. Med.* 135, 594 (2001).

M. Pavlík^a, J. Vacek^b, B. Klejdus^c, and V. Kubáň^c
^aDepartment of Natural Drugs, Veterinary and Pharmaceutical University, Brno, ^bInstitute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, ^cDepartment of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno): **High Performance Liquid Chromatographic Study of Influence of Saccharose and Poly(ethylene glycol) on Production of Hypericin and Hyperforin by *Hypericum perforatum* L.**

The influence of saccharose and poly(ethylene glycol) present in the cultivation medium on production of hypericin and hyperforin by *Hypericum perforatum* L. was evaluated in *in vitro* experiments. Hypericin and hyperforin were isolated by modified Soxhlet extraction with 80% ethanol and determined by HPLC with UV-Vis detection at 592 and 292 nm in less than 4 min. Calibration graphs were linear in the concentration interval 20–200 ng per injection (5 µl) with correlation coefficients $R^2 > 0.999$. Limits of detection (for the 3 S/N criterion) were 90 and 270 pg per injection for both hypericin and hyperforin. Addition of saccharose (10, 20 and 30 g dm⁻³) or PEG (1.25–5 g dm⁻³) to cultivation medium increased the production of both substances in plant tissues. Synthesis of both substances in most experimental plants was the same or lower at higher contents of PEG. Concentrations of hypericin and hyperforin in plants were of the order 10⁰ and 10³ µg g⁻¹, respectively. Morphological changes induced by saccharose and poly(ethylene glycol) were also observed and described.

VŠCHT Praha přijme vědeckého pracovníka/pracovníci pro oblast technické mineralogie na Ústav skla a keramiky.

Požadovaný profil vhodného uchazeče:

- VŠ vzdělání technického anebo přírodovědného směru,
- vědecká hodnost Ph.D. (Dr. nebo CSc.), případně perspektiva jejího obhájení v krátké době,
- zkušenosti v oblasti materiálů, mineralogie či optické mikroskopie jsou vítány.

Nabízíme:

- samostatnou práci na špičkovém pracovišti,
- příležitost k profesnímu rozvoji,
- pracoviště v blízkosti metra,
- pružnou pracovní dobu,
- příspěvek na stravování, návštěvu kulturních a sportovních zařízení, rekreaci, penzijní připojištění.

Nástup: září 2007

Kontakt: doc. RNDr. Ondrej Gedeon, Ph.D., tel. 220443695, ondrej.gedeon@vscht.cz