

## STANOVENÍ HYPERICINU *IN VITRO* V TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH *Hypericum perforatum* POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE

DAGMAR ŠTĚRBOVÁ<sup>a</sup>, BOŘIVOJ KLEJDUS<sup>a</sup>,  
EVA KRAMÁŘOVÁ<sup>b</sup> a VLASTIMIL KUBÁŇ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, <sup>b</sup>Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Palackého 1–3, 612 42 Brno  
e-mail: kuban@mendelu.cz

Došlo dne 20.VIII.2001

Klíčová slova: *Hypericum perforatum*, hypericin, kapalinová chromatografie, HPLC, fluorescenční detekce

### Úvod

Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum* L.) je vytrvalá bylina náležící do řádu Hypericaceae. Je rozšířena v Evropě, Asii, Severní Africe a zdomácněla také v USA. Do povědomí vstoupila již ve středověku, kdy se používala k léčení infekcí a mírných nervových poruch. Díky intenzivnímu studiu obsahových látek v posledních letech výrazně vzrostl její význam ve farmaceutickém průmyslu pro antivirové, protizánětlivé, antidepressivní, protirakovinné a antimikrobiální účinky naftodiantronových a floroglucinových derivátů<sup>1–3</sup>. Typickými představiteli naftodiantronů jsou hypericin a pseudohypericin (obr. 1).

V přírodních podmínkách jsou jejich obsahy limitovány řadou biotických i abiotických faktorů (klimatické podmínky, choroby, škůdci aj.). Vzhledem k těmto skutečnostem jsou předmětem zájmu alternativní zdroje hypericinu. Jedním z nich mohou být i tkáňové kultury. Řada autorů se zabývá studiem intenzity produkce sekundárních metabolitů v tkáňových kulturách. Kirakosian a spol.<sup>4</sup> uvádějí, že kalus *H. perforatum*, buněčné a orgánové kultury produkují hypericin v extrémně rozdílných množstvích. Produkce je závislá na morfologické diferenciaci a organogenezi. Autoři dokazují, že produkce hypericinu v buňkách může být stimulována elicitory, jako je mannan<sup>5</sup>, případně ovlivněna jinými faktory, jako jsou přísady sacharosy nebo antibiotik do kultivačního média. Tkáňové kultury poskytují příležitost lepší manipulace vedoucí ke zvýšení produkce hypericinu nad přirozenou hladinu obsaženou v rostlinách.

Vedle klasické spektrofotometrie patří k nejrozšířenějším metodám používaným při stanovení hypericinu a jeho derivátů vysokouúčinná kapalinová chromatografie ve spojení se spektrofotometrickou detekcí pomocí detektoru s diodovým polem (DAD), fluorimetrickou detekcí (FLD) a detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (MS)<sup>6–9</sup>. Cílem této práce bylo vyvinout dostatečně účinný postup pro extrakci a optimalizovat podmínky pro přesné a citlivé stanovení hypericinu v tkáňových kulturách pomocí vysokouúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) v kombinaci s fluorescenční detekcí.

### Experimentální část

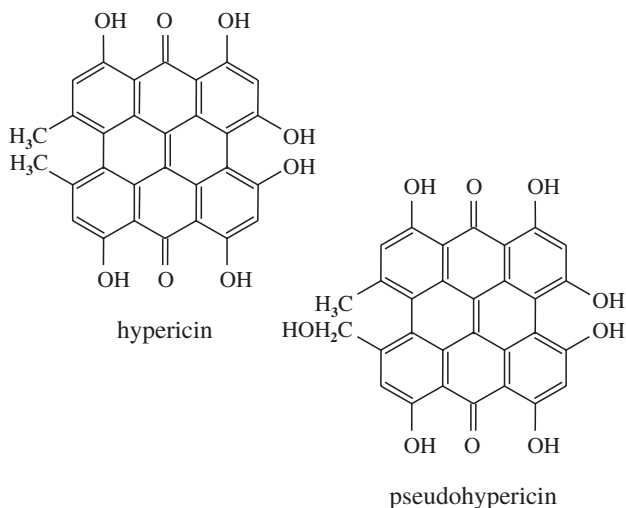
#### Chemikálie a přístroje

Acetonitril čistoty pro HPLC, který byl použit, byl výrobkem firmy Merck (Darmstadt, Německo). Pro veškeré roztoky a ředění byla použita deionizovaná voda Mili-Q (Millipore, Bedford, USA). Octan sodný byl analytické čistoty (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), hypericin čistoty HPLC byl dodán firmou Roth (Karlsruhe, Německo). Zásobní roztok standardu byl připraven rozpuštěním hypericinu v 80% ethanolu (v/v) čistoty pro HPLC a jeho koncentrace byly: 40  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , 4  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , 1,6  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , 0,8  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , 0,4  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  a 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Standardy byly uchovány ve tmě při teplotě 4 °C.

Ostatní chemikálie čistoty p. a. (6-(benzylamino)purin (BAP), kinetin, 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina (2,4-D), giberelová kyselina a sacharosa) a antibiotika (kanamycin a ticarcillin) byly běžně dostupné komerční preparáty firmy Sigma (Sigma Chemical Comp., St. Louis, USA), Lachema (Brno, ČR) nebo Serva Feinbiochemica (Heidelberg/New York, Německo/USA).

Pro stanovení hypericinu byl použit kapalinový chromatograf HP 1100 (Hewlett Packard, Waldbronn, Německo) sestávající z vakuového odplynovacího modulu (model G1322A), binární pumpy (model G1312A), autosampleru (model G1313A), termostatu kolon (model G1316A), UV/VIS DAD detektoru diodového pole (model G1315A) a FLD fluorescenčního detektoru (model G1321A). Separace byla prováděna na koloně Zorbax SB C18 (75×4,6 mm, velikost částic 5  $\mu\text{m}$ ) s reverzní fází. Byla použita eluce mobilní fází acetonitril (složka A) a 10  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  octan sodný (složka B) o počátečním složení od A:B 40:60 v/v v čase 0 minut a s lineárním gradientem s pozitivní směrnici na 100:0 do 8 minut a následně s negativní směrnici na 40:60 B do 18 minut. Průtok byl 1  $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$  a teplota termostatu kolon byla 40 °C. Signál byl snímán fluorescenčním detektorem při  $\lambda_{\text{Ex}} = 295 \text{ nm}$  a  $\lambda_{\text{Em}} = 600 \text{ nm}$  a UV/VIS DAD detektorem ve viditelné oblasti při 592 nm.

Při přípravě vzorků byla použita rotační vakuová odparka Model 350 (Unipan, Polsko) a ultrazvuková lázeň (Cole – Parmer Instrument Comp., Chicago, USA), počítačem řízený



Obr. 1. Strukturální vzorce hypericinu a pseudohypericinu

extraktor fexIKA Werke 50<sup>®</sup> (IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co., Staufen KG, Německo) a kulový mlýn Vibrom 2S (Jebavý s.r.o., Třebechovice p. O., ČR).

### Rostlinný materiál

Syntetické schopnosti byly studovány na rostlinách *Hypericum perforatum* L. var. Topaz pocházejících původně z kalusové kultury. Organogeneze byla navozena užitím 1,1 mg.dm<sup>-3</sup> 6-benzylaminopurinu (BAP), 0,45 mg.dm<sup>-3</sup> kinetinu, 0,45 mg.dm<sup>-3</sup> 2,4-dichlorofenoxyoctové kyseliny (2,4-D) a 2 mg.dm<sup>-3</sup> gibberelové kyseliny. Rostliny byly kultivovány 6 týdnů na médiu „Murashige and Skoog“<sup>10</sup> v poloviční koncentraci (Murashige and Skoog – MS 1/2) s přidavkem sacharosy (10, 30 a 100 g.dm<sup>-3</sup> média). Pro zamýšlenou selekci transgenických rostlin byla stanovována současně rezistence tohoto druhu vůči vysoké (150 mg.dm<sup>-3</sup> kanamycinu a 750 mg.dm<sup>-3</sup> ticarcillinu) a extrémní (250 mg.dm<sup>-3</sup> kanamycinu a 1250 mg.dm<sup>-3</sup> ticarcillinu) hladině antibiotik.

### Příprava vzorků

Vzorky byly odebrány z tkáňové kultury, zmrazeny tekutým dusíkem a lyofilizovány. Následně byly homogenizovány mletím v tekutém dusíku. Byly použity tři extrakční postupy. Ve všech případech bylo 20 mg lyofilizovaného materiálu extrahováno celkovým objemem 40 cm<sup>3</sup> 80%-ního ethanolu po dobu 60 minut: *i*) pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny při teplotě 80 °C, *ii*) dvoustupňovou extrakcí v extraktoru<sup>11</sup> fexIKA Werke 50<sup>®</sup> při 80 °C po dobu 2× 30 minut nebo *iii*) extrakcí ultrazvukem (sonikací) při 40 °C po dobu 60 minut. Extrakty byly odpařeny na vakuové odparce do sucha při teplotě 40 °C a odparek byl rozpuštěn v 1 cm<sup>3</sup> mobilní fáze (acetonitril:10 mmol.dm<sup>-3</sup> octan sodný = 40:60 v/v). Takto připravený vzorek byl injektován v množství 10 mm<sup>3</sup> do chromatografického systému.

### Výsledky a diskuse

Srovnání efektivity extrakčních technik bylo provedeno na základě porovnání ploch píků hypericinu naměřených u extraktů jednotlivých vzorků (tab. I). Z uvedené tabulky vyplývá, že v případě extrakce extraktorem fexIKA Werke 50<sup>®</sup> byla výtěžnost v průměru o 30 % vyšší proti extrakci ultrazvukem a o 50 % vyšší než při extrakci pod zpětným chladičem.

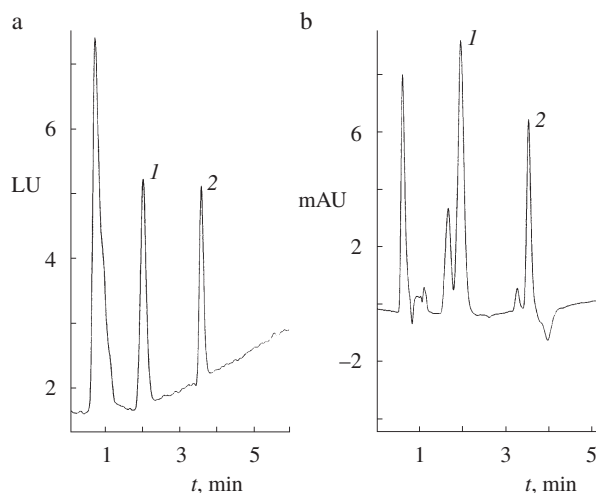
#### Tabulka I

Srovnání výtěžnosti extrakčních technik (uvedené v miliabsorbančních jednotkách – mAU jako průměrné výšky píků) pro shodné vzorky třezalky tečkované

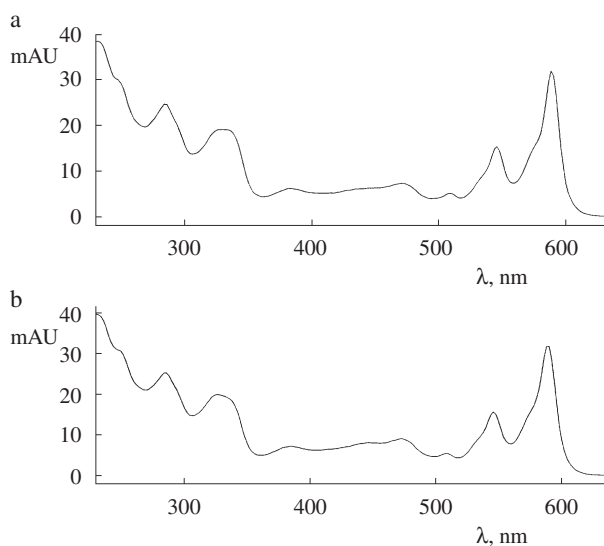
Typ extrakce	Hypericin [mAU.s]	RSD <sup>a</sup> [%]	Pseudohypericin [mAU.s]	RSD [%]
Ultrazvuk	41,6	5,2	97,9	4,5
Zp. chladič	30,1	5,8	70,6	5,1
FexIKA	60,3	4,3	141,5	3,8

<sup>a</sup> Pro  $n = 5$

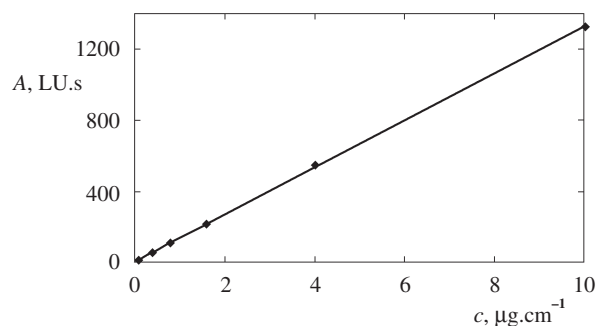
Pro stanovení hypericinu byla vypracována účinná metoda HPLC s tandemovou DAD a fluorescenční detekcí. Excitační a emisní maxima byla stanovena fluorescenčním detektorem FLD HP 1100 v tzv. režimu přímého nástřiku standardu. Emisní vlnová délka byla snímána přes vlnový rozsah 400 až 700 nm s konstantním krokem  $\Delta = 2$  nm a maximum bylo stanoveno na 600 nm. Excitační vlnová délka byla určena proměřením v rozsahu 200 až 350 nm s konstantním krokem  $\Delta = 2$  nm. Maximum bylo nalezeno při 295 nm.



Obr. 2. Chromatogram tkáňové kultury *Hypericum perforatum* var. Topaz s detekcí fluorescenčním  $\lambda_{\text{Ex}} = 295$  nm a  $\lambda_{\text{Em}} = 600$  nm (a) a UV/VIS DAD detektorem při 592 nm (b); chromatografické podmínky: kolona Zorbax SB C18 (75×4,6 mm, 5  $\mu$ m velikost částic), mobilní fáze acetonitril (A) a 10 mmol.dm<sup>-3</sup> octan sodný (B) o počátečním složení A:B 40:60 v/v v čase 0 minut s lineárním gradientem na 100:0 v/v do 8 minut a na 40:60 v/v do 18 minut, průtok 1 cm<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup> a teplota termostatu kolon 40 °C



Obr. 3. Absorpční spektra hypericinu (a) a pseudohypericinu (b) v ultrafialové a viditelné oblasti spektra snímána in-line UV/VIS DAD detektorem na výstupu z kolony; chromatografické podmínky viz obr. 2



Obr. 4. Kalibrační křivka hypericinu při detekci fluorescenčním detektorem při  $\lambda_{\text{Ex}} = 295 \text{ nm}$  a  $\lambda_{\text{Em}} = 600 \text{ nm}$ ; chromatografické podmínky viz obr. 2; A – plocha píku, c – koncentrace,  $y = 131,88x + 5,7542$ ,  $R^2 = 0,9998$

Tabulka II

Obsah hypericinu HP ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) v prýtech *Hypericum perforatum* L., var. Topaz kultivovaných *in vitro* v  $\mu\text{g.g}^{-1}$  s přidavkem 3 různých koncentrací sacharosy a při nulové, vysoké ( $150 \text{ mg.dm}^{-3}$  kanamycinu a  $750 \text{ mg.dm}^{-3}$  ticarcillinu) a extrémní ( $250 \text{ mg.dm}^{-3}$  kanamycinu a  $1250 \text{ mg.dm}^{-3}$  ticarcillinu) koncentraci antibiotik

Obsah sacharosy [g.dm <sup>-3</sup> ]	HP na hladině antibiotik		
	nulová	vysoká	extrémní
10	41,23	24,53	0
30	28,20	41,19	20,82
100	7,55	9,23	9,82

Porovnáním naměřených hodnot obsahů hypericinu bylo zjištěno, že koncentrace hypericinu při detekci ve viditelné oblasti spektra (592 nm), obr. 2, vykazovaly v průměru o 15,6 % vyšší zjištěné hodnoty než při detekci fluorescenčním detektorem v důsledku současné eluce jiné látky (pseudohypericinu) s obdobným absorpčním spektrem ve viditelné oblasti spektra (obr. 3). Tuto odchylku lze snadno snížit nebo zcela vyloučit použitím fluorescenčního detektoru, vzhledem k tomu, že pseudohypericin a další látka/látky vycházející z kolony současně s hypericinem nevykazují/nevykazují fluorescenci v dané oblasti<sup>7</sup>. Optimalizací gradientového profilu (viz výše) bylo navíc dosaženo kvalitního rozdělení naftodianthronových derivátů hypericinu a pseudohypericinu i při použití tzv. „rychlé kolony“ (fast column – viz ukázka chromatogramu na obr. 2). Její použití zajistí výrazné zkrácení doby analýzy a je zvláště výhodné pro rychlou orientaci při hodnocení biologických pokusů. Kalibrační křivka (obr. 4) byla lineární v koncentračním rozsahu od 0,1 do  $10 \mu\text{g.cm}^{-3}$  hypericinu s korelačním koeficientem při fluorescenční detekci  $R > 0,999$  a limitem detekce (LOD pro 3 S/N)  $0,006 \mu\text{g.cm}^{-3}$ .

Metoda byla aplikována na stanovení hypericinu v tkáňových kulturách *Hypericum perforatum* L. var. Topaz se stupňujícími se přidavky sacharosy do živného média a byla zároveň testována odolnost tkáňových kultur vůči antibiotikům. Rostliny kultivované při vysoké hladině sacharosy měly

změněný habitus (silně zkrácená internodia a oválný tvar čepelí listů vlivem omezení činnosti meristému) v důsledku osmotického stresu a nápadné změny v pigmentaci (listové čepele byly hnědočervené barvy, která však nebyla v korelaci s obsahem hypericinu).

Zeleně zbarvené rostliny kultivované na médiu Murashige and Skoog – MS 1/2 s přidavkem sacharosy  $10\text{--}30 \text{ g.dm}^{-3}$  vykazovaly významně vyšší obsah hypericinu (tab. II) než rostliny pěstované za osmotického stresu ( $100 \text{ g}$  sacharosy na  $1 \text{ dm}^3$  média). Narozdíl od přidavku sacharosy vliv antibiotik na syntézu hypericinu nebyl statisticky významný.

Rostliny *Hypericum perforatum* var. Topaz byly schopny tolerovat vysoké až extrémní hladiny antibiotik za předpokladu, že byl v médiu současně dostatek sacharosy. Při nízkých koncentracích sacharosy v médiu ( $10 \text{ g.dm}^{-3}$  média) a extrémních koncentracích antibiotik docházelo k odumírání rostlin během pokusu, zatímco rostliny pěstované na médiu s vyšším obsahem sacharosy ( $30 \text{ g.dm}^{-3}$  média) přežily i extrémní koncentrace antibiotik (tab. II).

## Závěr

Pro stanovení hypericinu v tkáňových kulturách byla vyvinuta rychlá a selektivní chromatografická metoda. Použitím tzv. rychlé (fast) chromatografické kolony Zorbax SB C18 ( $75 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$  velikost částic) bylo dosaženo velice krátkých retenčních časů sledovaných analytů (do 5 minut). Ve spojení s fluorimetrickou detekcí bylo dosaženo vysoké selektivity, neboť při dosud používané detekci ve viditelné oblasti spektra při 592 nm dochází k významným chybám při stanovení hypericinu vlivem současné eluce jedné nebo více látek s podobnými absorpčními spektry. Tyto chyby jsou díky použití fluorescenčního detektoru minimalizovány nebo zcela odstraněny, neboť tyto rušící látky nevykazují fluorescenci v dané oblasti. Metoda může s výhodou sloužit jako rychlá orientační metoda pro sledování dynamiky tvorby biologicky aktivních látek, pro fyziologické a biochemické studie sekundárních metabolitů i pro další vědecko-výzkumné účely.

Tato práce byla řešena v rámci výzkumného záměru MŠMT ČR reg. č. MSM 432100001.

## LITERATURA

- Lavie G., Mazur Y., Lavie D., Meruelo D.: Med. Res. Rev. 15, 111 (1995).
- Singer A., Wonnemann M., Müller W. E.: J. Pharmacol. Exp. Ther. 290, 1363 (1999).
- Jensen A. G., Hansen S. H., Nielsen E. R.: Life Sci. 68, 1593 (2001).
- Kirakosyan A., Vardapetyan H. R., Charchogyan A.: Russ. J. Plant Physiol. 47, 302 (2000).
- Kirakosyan A., Hayashi H., Inoue K., Charchogyan A., Vardapetyan H.: Phytochemistry 53, 345 (2000).
- Brolis M., Gabetta B., Fuzzati N., Pace R., Panzeri F., Peterlongo F.: J. Chromatogr. A 825, 9 (1998).
- Draves A. H., Walker S. E.: J. Chromatogr., B 749, 57 (2000).
- Liu F. F., Ang C. Y. W., Heinze T. M., Rankin J. D., Beger R. D., Freeman J. P., Lay J. O., Jr.: J. Chromatogr., A 888, 85 (2000).

9. Sirvent T., Gibson D. M.: *J. Liq. Chromatogr.* 23, 251 (2000).
10. Murashige T., Skoog F.: *Physiol. Plant.* 15, 473 (1962).
11. Redeker J.: Patent Application, DEP 1961, 12037.3, DEG 8411 672.

**D. Štěrbová<sup>a</sup>, B. Klejdus<sup>a</sup>, E. Kramářová<sup>b</sup>, and V. Kubáň<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno,* <sup>b</sup>*Department of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **High Performance Liquid Chromatographic Determination of Hypericin in Plant Tissues of *Hypericum perforatum* Cultivated *in vitro***

*Hypericum perforatum* is a medicinal plant that has been known in traditional medicine as an anti-inflammatory and

healing agent. The alcoholic extract of its aerial parts finds wide application for its antidepressant activity. Three methods of extraction into 80% ethanol were compared. An HPLC method with fluorimetric detection was developed for the identification of its constituents. The calibration curve was strictly linear in the concentration range from 0.1 to 10  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  of hypericin with the correlation coefficient  $R > 0.999$  and the detection limit (LOD for 3 S/N) 0.006  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . HPLC with fluorimetric detection can separate and detect naphthodianthrone derivatives in *Hypericum perforatum* in the presence of other constituents with a greater specificity than HPLC with spectrophotometric detection at 592 nm. Hypericin was quantified in the culture tissues of *Hypericum perforatum* L. var. Topaz cultivated under different conditions (saccharose and antibiotics concentrations) in the Murashige – Skoog medium.

# Jarmark

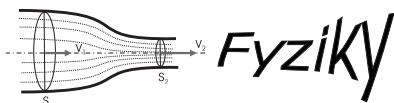
v pavilónu „A“ na výstavišti Flora

aneb poznej kouzlo

24. a 25. května 2002

V Olomouci

Chemie



$\sqrt[3]{(\text{Matematiky})^5}$

- měření tvrdosti přinesené vody (vodní kámen je prevít)
- určení obsahu metanolu v tatínkově slivovici
- kontrola kvality slunečních brýlí (vzhledem k UV záření)
- hrátky s plastovými lahvemi
- fyzika a chemie v kuchyni
- stanovení vitamínu C v ovocných nápojích
- počítačový „hyzdič“ dětí, rodičů, babiček a dědečků
- Debrujarijádá, matematické kvízy a hlavolamy
- soutěže („10× odpověz“, „Chemický kufr“), atd.

