

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDRAŽ POČIČ

**VPLIV Matriksov vzorca na analizo standarda hipericina in  
ekstraktov Šentjanževke s tekočinsko kromatografijsko  
visoke zmožljivosti**

**INFLUENCE OF SAMPLE'S MATRIX ON ANALYSIS OF HYPERICIN  
STANDARD AND ST. JOHN'S WORT EXTRACTS WITH HIGH-  
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

Diplomsko naložko sem opravljal na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. ter delovni mentorici Evi Tavčar, mag. farm. za vso pomoč in podporo pri delu v laboratoriju ter pisanju diplomske naloge. Za vso pomoč se prav tako zahvaljujem vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo. Hvala tudi Zei in družini za vzpodbudo in podporo pri pisanju diplomske naloge ter vsem, ki so mi omogočili, da sem prišel do te točke.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko naložko samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Rok Dreu, mag. farm.

Ljubljana, 2013

Andraž Počič

# KAZALO VSEBINE

POVZETEK .....	III
ABSTRACT .....	IV
SEZNAM OKRAJŠAV .....	V
1. UVOD .....	1
1.1. Šentjanževka ( <i>Hypericum perforatum</i> ) .....	1
1.2. Hipericini .....	2
1.2.1. Hipericin .....	3
1.2.2. Stabilnost hipericinov .....	5
1.3. Ekstrakti šentjanževke .....	7
1.3.1. Primeri priprave ekstraktov šentjanževke .....	8
1.3.2. Analiza ekstraktov šentjanževke .....	9
1.3.3. Retencijski časi hipericinov v ekstraktih .....	10
1.4. Kvantifikacija suhega ekstrakta šentjanževke – farmakopejska metoda .....	11
2. NAMEN DELA .....	13
3. MATERIALI IN METODE .....	14
3.1. Materiali .....	14
3.1.1. Rastlinski material .....	14
3.1.2. Reagenti in topila .....	14
3.1.3. Aparature .....	14
3.2. Metode .....	16
3.2.1. HPLC .....	16
3.2.2. Priprava ekstraktov šentjanževke .....	16
4. EKSPERIMENTALNO DELO .....	17
4.1. Analiza standarda hipericina .....	17
4.1.1. Razvoj HPLC metode za analizo standarda hipericina .....	17
4.1.2. Analiza standarda hipericina na HPLC v odvisnosti od različnih dodatkov .....	17
4.2. Analiza ekstraktov šentjanževke .....	21
4.2.1. Razvoj HPLC metode za analizo ekstraktov šentjanževke .....	21
4.2.2. Priprava različnih ekstraktov šentjanževke .....	22
4.2.3. Dodatek trietilamina .....	22

4.2.4. Dodatek ocetne kisline .....	23
4.2.5. Dodatek 1 % raztopine mešanice soli NaCl, MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O, Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) ×H <sub>2</sub> O in CaCO <sub>3</sub> .....	23
4.3. Analiza vpliva steklovine na vzorce.....	23
4.3.1. Vpliv na AUC vrednosti standarda hipericina .....	23
4.3.2. Vpliv na AUC vrednosti ekstraktov šentjanževke .....	24
5. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	25
5.1. Optimizacija HPLC metode za analizo standarda.....	25
5.2. Optimizacija HPLC metode za analizo ekstrakta šentjanževke .....	25
5.3. Analiza standarda hipericina .....	26
5.3.1. Spreminjanje AUC standarda hipericina brez dodatkov v odvisnosti od časa.....	26
5.3.2. Dodatek ocetne kisline .....	27
5.3.3. Dodatek trietilamina .....	29
5.3.4. Drugi vplivi na spremembo AUC .....	31
5.3.5. Reverzibilnost AUC pri dodatku kisline ali baze.....	32
5.3.6. Dodatek osnovnih raztopin in mešanic soli NaCl, MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O, Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) ×H <sub>2</sub> O in CaCO <sub>3</sub> .....	34
5.4. Analiza ekstraktov šentjanževke .....	36
5.4.1. Ugotavljanje retencijskega časa hipericina v ekstraktu šentjanževke .....	36
5.4.2. Ugotavljanje retencijskih časov ostalih hipericinov v ekstraktu šentjanževke .....	37
5.4.3. Vpliv različnih metod ekstrakcije na vsebnost hipericinov .....	39
5.4.4. Dodatek trietilamina v ekstrakte šentjanževke.....	43
5.4.5. Dodatek ocetne kisline v ekstrakte šentjanževke .....	46
5.4.6. Dodatek 1 % raztopine mešanice soli NaCl, MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O, Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) ×H <sub>2</sub> O in CaCO <sub>3</sub> v ekstrakte šentjanževke .....	47
5.5. Vpliv steklovine na vzorce .....	48
5.5.1. Vpliv steklovine na AUC vrednost standarda hipericina .....	48
5.5.2. Vpliv steklovine na AUC vrednost ekstraktov.....	51
5.6. Ustreznost farmakopejske metode .....	53
6. SKLEP .....	54
7. LITERATURA .....	56

## **POVZETEK**

Šentjanževka je trajnica, ki je razširjena po Evropi. Povečano zanimanje za njeno uporabo, predvsem standardiziranih ekstraktov, pa je posledica antidepresivnih učinkov različnih farmakološko aktivnih snovi, med katerimi so tudi hipericini (hipericin, protohipericin, psevdohipericin ter protopsevdohipericin).

Namen diplomske naloge je bil, da bi ugotovili, ali matriks, ki ga je predstavljal dodatek ocetne kisline, trietilamina, mešanice in posameznih soli  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  in  $\text{CaCO}_3$ , vpliva na rezultate analize vzorca standarda ter ekstraktov šentjanževke. Če bi zunanji vplivi zvišali ali znižali površino pod krivuljo hipericina, ki se v farmakopejski metodi uporablja za kvantifikacijo suhega ekstrakta šentjanževke, bi posledično lahko dobili napačne rezultate. V kislih raztopinah pride namreč do protonacije molekule hipericina, v alkalnih do deprotonacije, oboje pa vpliva na absorpcijski ter fluorescenčni spekter in posledično na površino pod krivuljo.

Tekom analiz smo ugotovili, da tako pri vzorcu standarda kot ekstraktov dodatek kisline in baze vplivata na površino pod krivuljo. Na rezultate vpliva tudi dodatek soli, v tem primeru pa je sprememba odvisna tudi od tipa ter količine dodane soli. Pri analizi vpliva steklovine na vzorce smo ugotovili, da pri vzorcih standarda material, iz katerega sta izdelana viala ter njen insert ter spiranje vial vpliva na rezultate. Material pa po dobljenih rezultatih očitno ne vpliva na analizo ekstrakta, saj se v tem primeru AUC vrednosti niso spremenjale.

## **ABSTRACT**

St. John's Wort is a perennial that is spread all across Europe. Increased interest for its use, especially its standardized extracts, is related to antidepressive effect of various pharmacological substances, including hypericins (hypericin, protohypericin, pseudohypericin, protopseudohypericin).

Aim of our work was to determine influence of different sample's matrix, which was represented as aditions of acetic acid, triethylamine and simple or mixed saline solutions of  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  and  $\text{CaCO}_3$  on HPLC analysis of hypericin standard and St. John's Wort extracts. For quantification of dry St. John's Wort extracts European Pharmacopoeia uses hypericin's area under the curve, which could be influenced by external factors. In acid solutions hypericin is transformed in its protonated form and in alkaline solutions to its deprotonated form. Both forms can have effect on absorption and fluorescence spectra, resulting in change of area under the curve.

We have found out that area under the curve changes if we add acid or alkaline solution, independent of the sample's composition. Results also change if we add salt solutions, but in this case the change depends on the type and concentration of salt. While examining influence of glass type on the samples we have found out that glass type and previous rinsing with methanol can influence results when analysing standard solution, but in the case of extract samples glass type obviously has no effect.

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

AUC – površina pod krivuljo

AUC<sub>max</sub> – maksimalna površina pod krivuljo

DMSO - dimetilsulfoksid

H<sup>+</sup> - proton

HyH - nevtralna oblika hipericina

Hy<sup>-</sup> - hipericin anion

HPLC – tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti

LC – tekočinska kromatografija

MeOH – metanol

MF – mobilna faza

RP-HPLC - reverznofazna tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti

SF – stacionarna faza

TEA - trietilamin

TFA - trifluoroocetna kislina

THF – tetrahidrofuran

UV – ultravijolična

VIS – vidna svetloba

# 1. UVOD

## 1.1. Šentjanževka (*Hypericum perforatum*)

Rod *Hypericum*, ki ga sestavlja okoli 450 vrst rastlin, grmov in dreves, pripada družini Clusiaceae (Guttiferae). V tem rodu ima največjo prepoznavnost ter komercialno uporabnost vrsta *Hypericum perforatum*, ki je pri nas poznana tudi pod imenom šentjanževka (1, 2). Šentjanževka (slika 1) je trajnica, ki je široko razširjena po Evropi, raste pa tudi v Severni Ameriki, Aziji, severni Afriki in v določenih delih Avstralije (3). Zraste do višine 70 cm in ima pokončna stebla. Listi so jajčasti, brez pecljev, če jih pridržimo proti svetlobi v njih vidimo prosojne pike, kjer je shranjeno eterično olje. Rumeni cvetovi imajo veliko prašnikov in rumene venčne liste, posejane s temnimi žleznimi pikami. Za uporabo v času cvetenja (od junija do avgusta) nabiramo njene nadzemne dele in jih sušimo (4, 5, 6).

Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin šentjanževko razvršča v kategorijo Z, kamor se razvrščajo zdravilne rastline, ki so namenjene za preprečevanje in zdravljenje bolezni in bolezenskih stanj. Izdelki za peroralno uporabo, ki vsebujejo zdravilne rastline iz te kategorije v naravni ali predelani obliki, se praviloma razvrstijo med zdravila, za katera ni potreben zdravniški recept (7).



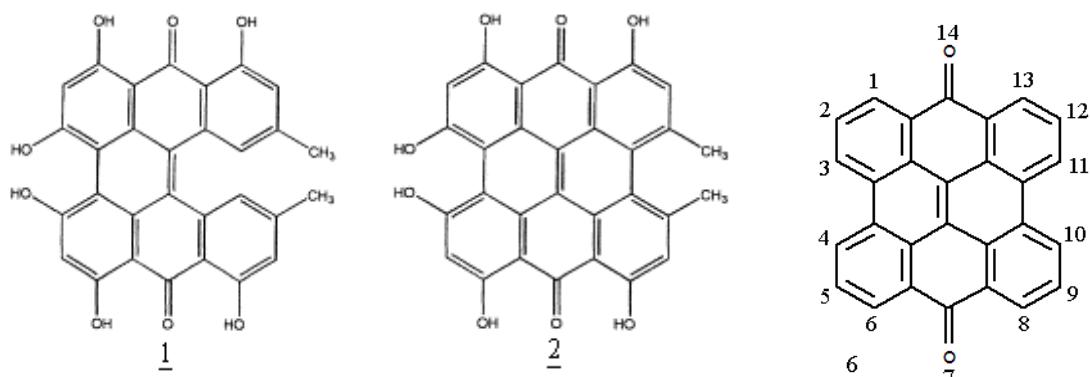
Slika 1: Šentjanževka (nadzemni del rastline).

Povečano zanimanje za uporabo šentjanževke, predvsem njenih standardiziranih ekstraktov, je posledica antidepresivnih učinkov, študije pa so pokazale, da imajo šentjanževka in njeni ekstrakti protivirusne, protimikrobne ter protirakave učinke, pomagajo pa tudi pri celjenju ran (2, 8). V rastlini in ekstraktih lahko najdemo različne farmakološko aktivne snovi, kot so fluoroglucinoli (hiperforin, hiperfirin), naftodiantroni (hipericin, protohipericin, psevdohipericin, protopsevdohipericin – s skupnim imenom poimenovani hipericini) in širok spekter flavonoidov (hiperozid in rutin) (2, 8, 9).

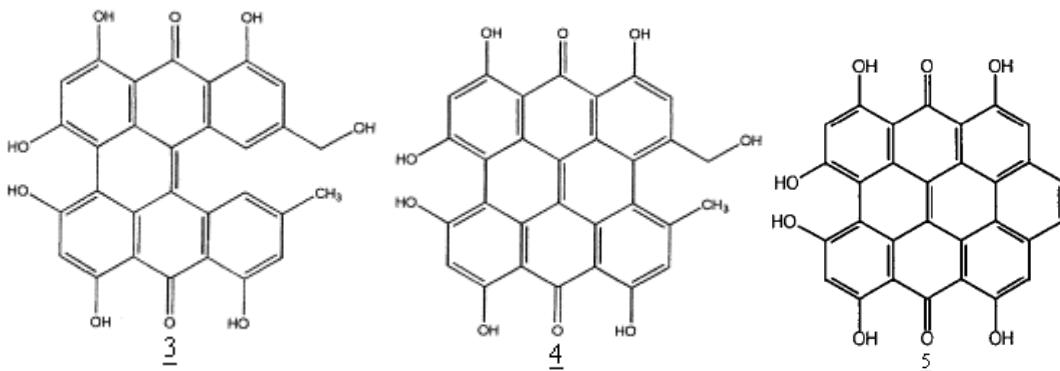
## 1.2. Hipericini

Hipericini se delijo na pet spojin (sliki 2 in 3): protohipericin (**1**), hipericin (**2**), protopsevdohipericin (**3**) ter psevdohipericin (**4**), ki so glavni, v manjših količinah pa se v ekstraktih lahko nahaja še ciklopsevdohipericin (**5**) (9, 10). Zaradi njihove strukture jih prištevamo med naftodiantrone (**6**).

Hipericin in psevdohipericin sta po zaužitju fototoksična in lahko na koži sprožita alergijsko reakcijo - hipericizem. Vzrok za to reakcijo je koncentriranje obeh spojin v podkožju, kamor preideta po absorpciji v prebavnem traktu. Alergijska reakcija nastopi po izpostavitvi soncu in se kaže kot rdečica, poškodba tkiva, v ekstremnih primerih pa lahko nastopi tudi smrt. Zaradi tega se sončenje ter obsevanje z ultravijoličnimi (UV) žarki po zaužitju šentjanževke ter njenih pripravkov odsvetuje (11, 12, 13).



Slika 2: Strukturi protohipericina (**1**), hipericina (**2**) in oštevilčena struktura naftodiantrona (**6**).



Slika 3: Strukture protopsevdohipericina (3), psevdohipericina (4) ter ciklopsevdohipericina (5).

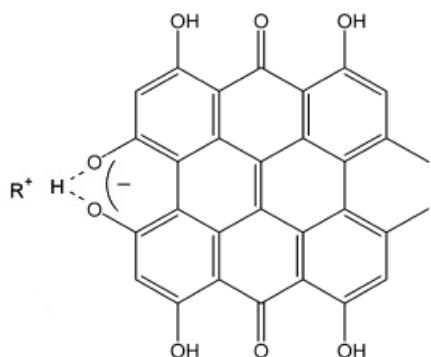
### 1.2.1. Hipericin

Hipericin je naftodiantron, ki je bil izoliran iz mnogih vrst šentjanževke (*Hypericum spp.*) (14). V rastlini se sintetizira v večceličnih temnih žlezah, ki se nahajajo v listih, steblu, venčnih in cvetnih listih ter prašnikih (15, 17). Zobayed in sod. so ugotovili, da je vzrok za različno vsebnost hipericina v rastlinskih organih v tem, da nekateri organi vsebujejo več temnih žlez kot drugi. Največ temnih žlez in posledično tudi hipericina je v prašnikih, to pa je vzrok, zakaj največ hipericina najdemo prav v cvetovih (17). Analize šentjanževke, ki so jih izvedli v Avstraliji, so pokazale, da je, če primerjamo liste, steblo in cvetove, najvišja vsebnost hipericina v cvetovih. Pri primerjavi vsebnosti v ozkih in širokih listih pa so ugotovili, da je višja vsebnost v ozkih listih. Koncentracije hipericina, ki so jih izmerili, so bile med 40 ppm (široki listi in steblo) in 5190 ppm (ozki listi, cvetovi) (16).

### Struktura hipericina

Struktura hipericina je bila določena pred 45. leti. V starejših raziskavah je hipericin predstavljen kot tautomerna oblika s karbonilnima skupinama na mestih 7 in 14 v naftodiantronskem obroču (tavtomer Q<sup>7,14</sup>), teoretične analize pa kažejo, da je ta oblika le ena izmed 16. možnih strukturnih tavtomerov. Najstabilnejši tavtomer je Q<sup>7,14</sup>, sledita pa mu Q<sup>1,6</sup> ter Q<sup>1,7</sup> (21).

Molekulo hipericina je mogoče izkristalizirati iz piridina v obliki ionskega para hipericin monoanion ter piridinijev kation. Ionizacija poteče na -OH skupinah, ki se nahajata na mestih 3 in 4 (slika 4), vzrok za ionizacijo pa je bližina obeh -OH funkcionalnih skupin, ki se nahajata v sterično ovirani okolini (21).



**Slika 4: Ionizacija hipericina na mestih 3 in 4 ter tvorba monoaniona.**

Začetni poskusi elucidacije oblik  $\text{Hy}^-$  ter  $\text{HyH}$  so pokazali, da je hipericin v nestabilni nevtralni strukturi v obliki 1,6-diketo tautomera ( $\text{Q}^{1,6}$ ), anionska stabilna struktura pa je v obliki 7,14-diketo tautomera ( $\text{Q}^{7,14}$ ). Zadnje raziskave pa so pokazale, da sta obe strukturi v obliki 7,14-diketo tautomera ( $\text{Q}^{7,14}$ ). Te rezultate je potrdila tudi študija, ki so jo izvedli Skalkos in sod., kjer so ugotovili, da obstaja 7,14-diketo oblika tako v protičnih kot aprotičnih topilih, razlika pa je le v stopnji ionizacije  $-\text{OH}$  skupin na mestih 3 in 4 (21).

V članku, ki so ga objavili Arabei in sod., so zapisali, da pride v kislih raztopinah do protonacije molekule, v alkalnih do deprotonacije, oboje pa vpliva na absorpcijski ter emisijski spekter. Pri  $\text{pH} = 1$  pride do protonacije karbonilnih skupin. Protoni ( $\text{H}^+$ ) se vežejo na karbonilne skupine, pretrgajo intramolekularne vodikove vezi in tvorijo strukturni fragment  $\text{C=O} \cdots \text{H}^+$ . V tem primeru ne pride do spremembe oblike absorpcijskega ter emisijskega spektra, opazi pa se rahel premik k nižjim valovnim dolžinam (hipsokromni premik). Pri  $\text{pH} \geq 7$  pride najprej do deprotonacije na  $-\text{OH}$  skupinah na mestu 3 in 4, pri še višjih pH vrednostih pa pride do dodatne deprotonacije  $-\text{OH}$  skupin na mestih 1, 6, 8 ter 13. Ta deprotonacija je povezana s spremembjo oblike absorpcijskega pasu, ki se razširi, pojavi pa se premik absorpcije k daljšim valovnim dolžinam (batokromni premik) (22).

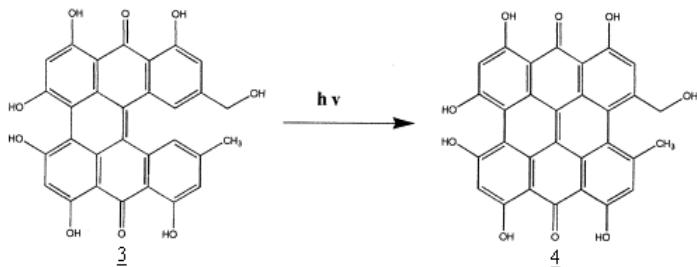
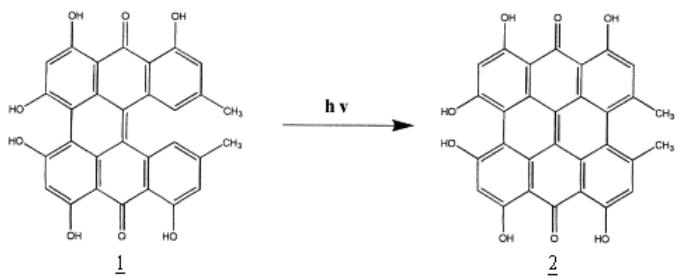
V polarnih ter nekaterih nepolarnih topilih je lahko hipericin tudi v obliki agregatov. V tem primeru se absorpcijski pas pri valovni dolžini okoli 600 nm, ki je drugače značilen za

monomer hipericina, zniža ter razširi. Agregacija molekul hipericina tako občutno spremeni biofizične lastnosti molekule, večina fotodinamičnih lastnosti pa se ob tem izgubi (22). Huygens in sod. so ugotovili, da pride do tvorbe agregatov in precipitatov v vodnih raztopinah, na fizikalne lastnosti hipericina pa vplivajo tudi soli (ionski pari) hipericina. Različne soli imajo namreč različno topnost v organskih topilih in vodi (npr. topnost lizinijevega hipericinata v vodi je bila kar 10-krat višja od topnosti natrijevega hipericinata), zato sklepajo, da imajo posamezni ionski pari različno sposobnost tvorbe precipitatov (30). Huntosova in sod. pa so prišli do zaključka, da je lahko tvorba agregatov tudi posledica povišanja koncentracije hipericina. Ko so v lipoproteinih, ki so jih preučevali, koncentracijo hipericina povišali, se je fluorescenza dramatično znižala, kar nakazuje na možnost, da je prišlo do samo-dušitve odziva zaradi tvorbe agregatov (31).

### **1.2.2. Stabilnost hipericinov**

Pod vplivom svetlobe imajo naftodiantroni različno stabilnost, ki je posledica različnih mehanizmov oksidacije. Ko so raztopino vzorca s hipericini šest ur pustili na svetlobi, so po analizi s tekočinsko kromatografijo visoke zmogljivosti (HPLC) ugotovili, da se količini hipericina in psevdohipericina povečata na račun protohipericina ter protopsevdohipericina, ki imata odprte obroče. Kromatografska primerjava je pokazala, da je tvorba obroča (ciklizacija) glavna transformacija proto- oblik, ki se zgodi po izpostavitvi svetlobi (slika 5). Izpostavitev svetlobi pa ne vpliva na strukturo hipericina, ki je ostal stabilen tudi 48 h po izpostavitvi svetlobi. Vzrok za stabilnost je v tem, da je struktura hipericina močno konjugirana in tako ni občutljiva na reakcije z radikali (19). Pri valovni dolžini 590 nm obe proto- oblici slabše absorbirata, hipericin ter psevdohipericin pa absorbirata to svetlobo (9).

Zaradi pretvorbe na svetlem je smiselno, da se HPLC analiza izvede šele takrat, ko je bil vzorec izpostavljen svetlobi in je pretvorba potekla v celoti. Če je vzorec izpostavljen sončni oz. naravnemu dnevnu svetlobi, popolna pretvorba poteče v času dveh ur. Ker ta čas podaljša pripravo vzorca, je Schmidt razvil metodo, pri kateri s pomočjo žarnice, ki proizvaja umetno dnevno svetlogo, popolna pretvorba poteče že v 138 s. To je dosegel tako, da je med avtoinjektor ter kolono vgradil fotokemični reaktor, skozi katerega je potoval vzorec, med potjo pa ga je žarnica obsevala s svetlobo (18).



**Slika 5: Pretvorbi protohipericina (1) v hipericin (2) ter protopseudohipericina (3) v psevdohipericin (4), ki potečeta pod vplivom svetlobe.**

Stabilnost hipericinov so preučevali tudi v nevtralnem pH. Ugotovili so, da v tem primeru, če vzorec s hipericini ni bil izpostavljen svetlobi, tudi v 3 – 4 dneh ni prišlo do ciklizacije ali do drugih transformacij. Do pretvorb hipericinov pa je prišlo v kislem pH. V tem primeru so izvedli dva poizkusa:

1. kisel pH brez izpostavitev svetlobi;
2. kisel pH in izpostavitev svetlobi.

V prvem primeru ni prišlo do tvorbe obroča ampak do razgradnje hipericinov. V drugem primeru pa je prišlo do večih sprememb, saj je bila prisotna tako tvorba obroča (ciklizacija proto- oblik) kot tudi druge spremembe v strukturi. Koncentracija hipericina in psevdohipericina se je v prvih treh urah zaradi ciklizacije povečala na račun proto- oblik, nato pa je s časom konstantno padala. Prisotnost kisline očitno povzroči, da hipericin in psevdohipericin s časom razpadeta (19).

V študiji, ki je preverjala stabilnost hipericina in psevdohipericina, pa so Fourneron in sod. ugotovili, da bazični pH ne vpliva na stabilnost hipericina, pride pa do nestabilnosti psevdohipericina. Ko so raztopino, ki je vsebovala hipericin, naalkalili, so ugotovili, da je absorpcijski vrh, ki je značilen za hipericin in ga vidimo pri valovni dolžini 590 nm, izginil,

namesto njega pa se je pojavil nov vrh pri valovni dolžini 622 nm. Po nevtralizaciji se je ponovno pojavil vrh pri valovni dolžini 590 nm. Ko so naalkalili raztopino s psevdohipericinom, pa so ugotovili, da absorpcijski vrh psevdohipericina, ki se prav tako pojavi pri valovni dolžini 590 nm, izgine, ne pojavi pa se nov vrh pri kateri drugi valovni dolžini. Tudi po nevtralizaciji se vrh pri 590 nm ne pojavi znova, kar je dokaz, da psevdohipericin v alkalnem ni stabilen. Kakšen je mehanizem razpada, avtorji niso ugotovili, saj s pomočjo HPLC niso našli nobenega novonastalega produkta. Sklepajo, da bi lahko prišlo do polimerizacije med do sedaj nedoločenimi polifenolnimi spojinami (20).

### **1.3. Ekstrakti šentjanževke**

Čeprav so ekstrakti šentjanževke zelo popularni in se uporabljajo za različne namene, predvsem za zdravljenje blage do zmerne depresije, pa točen farmakološki učinek komponent ekstrakta še danes ni razjasnjen (23). V nasprotju s sintetičnimi zdravilnimi učinkovinami vsebuje ekstrakt šentjanževke namreč mešanico aktivnih učinkovin in pomožnih snovi, jasna določitev snovi, ki imajo učinek, pa je nemogoča. Zato se v terapevtske namene uporablja ekstrakt šentjanževke, ki se izdela iz nadzemnih ali samo cvetočih delov rastline (24).

Učinek ekstrakta je odvisen predvsem od topila, s katerim je izdelan. Vodni ekstrakti vsebujejo več hidrofilnih komponent (flavonoidi, tanini in fenolne kisline) in ne vsebujejo hipericina, zato se tradicionalno uporabljajo pri gastrointestinalnih težavah, delujejo pa tudi protivnetno. Ekstrakti, izdelani iz etanola (50 – 80 V/V %) ali MeOH (50 – 80 V/V %) pa vsebujejo hipericin ter hiperforin, ki izkazujeta učinek na centralni živčni sistem. (24).

Hipericini so netopni v vodi, delno topni v polarnih organskih topilih in popolnoma netopni v nepolarnih topilih (25). V komercialnih preparatih, ki vsebujejo ekstrakt šentjanževke, se kot topilo za ekstrakcijo uporablja etanol, v študijah pa je MeOH uporabljen kot topilo, ki je po svojih lastnostih najbolj podobno etanolu (19). Najboljše rezultate dajo ekstrakcije v hladnem z uporabo polarnih topil. V teh primerih se tudi zmanjša število razgradnih produktov, priporoča se tudi odsotnost svetlobe, ki lahko razgradi fluoroglucinolne derivate ter naftodiantrone, ki so fotosenzitivni (26).

### **1.3.1. Primeri priprave ekstraktov šentjanževke**

Liu in sod. so ekstrakt šentjanževke pripravili tako, da so 5 mg kupljene zmlete droge prelili s 30 ml MeOH, ki so ga predhodno 10 min preprihovali z dušikom. Erlenmajerico so nato zavili v aluminijasto folijo, da so vzorec zaščitili pred svetlobo in jo za 30 min postavili v ultrazvočno kad. Po tem času so izvedli še centrifugiranje, ki je potekalo pri 3000 rpm 10 min, da so dobili čist supernatant (19).

Ekstrakt, ki so ga pripravili Fourneon in sod., je bil izdelan iz cvetov šentjanževke, ki so jo nabrali v mesecu juniju. Rastlino so posušili na zraku in jo zmleli šele pred samim začetkom ekstrakcije. 5 g zmlete droge so ekstrahirali z etanolom ali acetonom v avtomatskem ekstraktorju tekoče-trdno. Vsaka ekstrakcija je bila sestavljena iz naslednjih korakov: dodatek 10 ml izbranega topila k drogi, segrevanje na 50 °C, 10-minutna inkubacija, odstranjevanje topila in preprihovanje z dušikom. Z vsakim topilom so izvedli tri cikle in dobili tri alikvote ekstrakta, ki so jih na koncu združili (20).

Li in sod. sta ekstrakt pripravila tako, da sta 200 mg uprašene šentjanževke ekstrahirala z MeOH 10 min. Ekstrakcija je potekala 10 min na temnem v ultrazvočni kadi s temperaturo vode okoli 11 °C. Po ekstrakciji je sledila centrifugacija pri sili 7 g, ki je trajala 10 min, dobljeni supernatant pa sta nato prelila v 10 ml bučko in z MeOH dopolnila do oznake (8).

Skalkos in sod. so nadzemne dele šentjanževke, ki so jih nabrali konec junija, zmleli. Ekstrakcija, ki je sledila, je potekala v temnem. 1 g zmlete droge so dodali 10 ml MeOH in vse skupaj za 60 min postavili v ultrazvočno kad. Dobljeni ekstrakt so nato 10 min centrifugirali, supernatant pa prefiltrirali skozi filter s porami 0,45 µm. Dobljene vzorce so do analize shranili na temnem pri temperaturi -20 °C (21).

Gadzovska in sod. so ekstrakt pripravili tako, da so 50 – 100 mg liofiliziranih in uprašenih delov šentjanževke prelili s 5 ml MeOH in postavili v ultrazvočno kad za 15 min. Sledilo je nučanje z Büchnerjevim lijem ter presesalno erlenmajerico. Filtrat so pod znižanim tlakom koncentrirali do suhega, nato pa ga sprali z destilirano vodo, ki ji je bil dodan 1 % ocetne kisline. S tem postopkom so fenolne komponente v vzorcu pretvorili v njihovo protonirano obliko. Prečiščen ekstrakt so ponovno posušili do suhega ter ga raztopili v 1,5 mL MeOH (27).

### **1.3.2. Analiza ekstraktov šentjanževke**

Za identifikacijo in karakterizacijo aktivnih sestavin ekstraktov šentjanževke lahko uporabimo različne analizne metode (3). Čeprav je fokus kliničnih študij, kjer preučujejo antidepresivne učinke šentjanževke, predvsem hiperforin, ki je ena izmed glavnih sestavin, pa je le-ta nestabilen ob prisotnosti kisika in svetlobe. Zaradi tega za standardizacijo ekstraktov raje uporabljam hipericine, ki jih lahko karakteriziramo s pomočjo HPLC (29). Najpogosteje se uporablja reverznofazna tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (RP-HPLC), pri kateri stacionarno fazo (SF) predstavlja oktadecil (C18) silikagel (3). V različnih študijah so raziskovalci ločbe hipericinov izvedli na reverznofaznih C18 kolonah, ki so se med sabo razlikovale po proizvajalcu, velikosti delcev, dolžini in notranjem premeru (3, 8, 19, 23, 25, 27, 28, 29).

Do večjih razlik v rezultatih je prihajalo pri sestavi mobilne faze (MF). Pages in sod. so zapisali, da so v večini primerov MF, ki se uporablajo pri ločbah, kompleksne in sestavljene iz vodno-organskih mešanic acetonitrila in MeOH ali MeOH in THF. Kot najboljša MF se je izkazala mešanica metanola, acetatnega pufra in etil acetata (68/16/16, V/V/V) (3).

Li in sod. so za ločbo uporabili dve MF. MF A je sestavljal voda, ki ji je bilo dodanega 20 % metanola in 0,5 % TFA. MF B pa je sestavljal aceton, ki mu je bilo dodanega 10 % metanola in 0,5 % TFA. Ločbo so pričeli z 90 % MF A. Od 0. – 20. min je odstotek MF A padel na 30 %, od 20. – 25. min na 10 %, od 25. – 30. min pa na 0 %, kjer je ostal do 60. min. Od 60. – 65. min pa se je odstotek MF A spremenil nazaj na 90 %. Pretok na koloni je znašal 1,0 ml/min, volumen injiciranja pa 10 µl (8).

Liu in sod. pa so za ločbo uporabili nevtralno MF, ki sta jo sestavljali MF A (mešanica 20 mM amonijevega acetata in acetonitrila v razmerju 9:1) in MF B (acetonitril). Gradientna ločba je potekala s pretokom 1 ml/min in se je pričela s 50 % MF B. Odstotek MF B se je med 2. – 22. min linearно povečeval do 100 %, ta vrednost je bila nato naslednjih 15 min konstantna, nato pa se je odstotek vrnil na začetno vrednost. Volumen injiciranja je znašal 15 µl (19).

Priprava MF, ki so jo uporabili Bauer in sod., je potekala po sledečem postopku: 6,7 ml koncentrirane fosforne kisline so razredčili z 950 ml destilirane vode in s 30 % raztopino natrijevega hidroksida v vodi uravnali pH na 4. Da so dobili končni volumen 1000 ml, so dodali destilirano vodo. 300 ml te raztopine so nato združili s 450 ml MeOH in 250 ml THF,

kar je predstavljalo končno MF. Pretok na koloni je znašal 0,75 ml/min (23).

Gioti in sod. so ločbo izvedli z MF, ki jo je sestavljalo 95 volumskih delov MeOH in 5 volumskih delov fosfatnega pufra (pH 2,2). Fosfatni pufer so pripravili tako, da so 2,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> raztopili v 950 ml dvakrat destilirane vode, uravnali pH na 2,2 s koncentrirano fosforno kislino in z dvakrat destilirano vodo dopolnili do 1000 ml. Ločba je potekala izokratsko s pretokom 1 ml/min (25).

V študiji, ki so jo izvedli Gadzovska in sod., so uporabili dve MF, ki so ju predhodno prepihalo s helijem. MF A je sestavljal 0,01 M trietilamonijev acetatni pufer s pH = 7, MF B pa je bila mešanica MeOH in acetonitrila (5:4, V/V). Ločba je potekala s 40 % MF A in 60 % MF B (0. – 3. min), 8 % A in 92 % B (4. – 9. min) in 0 % A ter 100 % B (10. min). Pretok na koloni je znašal 1,5 ml/min, volumen injiciranja na kolono pa 20 µl (27).

De los Reyes in sod. so pripravili MF, ki je vsebovala acetonitril in 0,3 V/V% ortofosforno kislino (90:10, V/V). Z 1 N fosforno kislino so pH uravnali na 2,5, nato pa so MF še prefiltrirali skozi membrano Nylon 100 proizvajalca Alltech (29).

### **1.3.3. Retencijski časi hipericinov v ekstraktih**

Po ločbi suhega ekstrakta, ki so jo izvedli Pages in sod. in je trajala 10 min, so ugotovili sledeče retencijske čase hipericinov: protopsevdohipericin (3,53 min), psevdohipericin (3,88 min), protohipericin (6,43 min) ter hipericin (8,62 min) (3).

Ločba, ki so jo izvedli F. Liu in sodelavci, je trajala 48 min, ugotovili pa so sledeče retencijske čase hipericinov: protopsevdohipericin (7,38 min), psevdohipericin (9,21 min), protohipericin (15,15 min) in hipericin (17,81 min) (19).

V študiji, ki so jo izvedli Li in sod., so ugotavljali retencijske čase različnih komponent ekstrakta. Za nas sta bila pomembna retencijska časa psevdohipericina in hipericina, ki sta se iz kolone eluirala pri času 34,55 min in 49,97 min (8). Podobno dinamiko ločbe so ugotovili tudi de los Reyes in sod. V študiji, ki so jo izvedli, se je psevdohipericin iz kolone eluiral ob času 3 min, hipericin pa 8,5 min (29).

## **1.4. Kvantifikacija suhega ekstrakta šentjanževke – farmakopejska metoda**

V Ph. Eur. 7.0. (32) je monografija kvantificiranega suhega ekstrakta šentjanževke (*Hyperici herbae extractum siccum quantificatum*). Priprava ekstrakta se izvede z uporabo etanola ali MeOH (50 – 80 V/V %), v monografiji pa je opisan postopek za določanje celokupne vsebnosti hipericinov v suhem ekstraktu, ki se izvede s pomočjo tekočinske kromatografije (LC).

**Priprava testne raztopine:** v 25.0 ml *metanola R* raztopimo 70.0 mg ekstrakta, postavimo na ultrazvok ter centrifugiramo. Nato raztopino za 8 min izpostavimo svetlobi ksenonske luči z močjo 765 W/m<sup>2</sup>.

**Priprava referenčne raztopine:** v 25.0 ml *metanola R* raztopimo takšno količino *suhega ekstrakta šentjanževke HRS*, ki ustreza 0.15 mg hipericinom, postavimo na ultrazvok ter centrifugiramo. Nato raztopino za 8 min izpostavimo svetlobi ksenonske luči z močjo 765 W/m<sup>2</sup>.

*Kolona:*

- *dolžina = 0.15 m, Ø = 4.6 mm;*
- *SF = oktadecil silikagel za kromatografijo R (5 µm);*
- *temperatura = 40 °C.*

*MF:* zmešaj 39 volumskih enot *etil acetata R*, 41 volumskih enot raztopine 15,6 g/l natrijevega *dihidrogenfosfata R*, ki ima pH uravnан na 2 s *fosforo kislino R* in 160 volumskih delov *metanola R*.

*Pretok:* 1.0 ml/min.

*Detekcija:* spektrofotometer pri valovni dolžini 590 nm.

*Injiciranje na kolono:* 20 µl.

*Čas ločbe:* 15 min.

*Identifikacija vrhov:* Za identifikacijo vrhov, ki pripadajo hipericinu in psevdohipericinu, primerjamo kromatogram *suhega ekstrakta šentjanževke HRS* ter kromatogram referenčne raztopine.

*Ustreznost sistema:* referenčna raztopina:

- dobljeni kromatogram je podoben kromatogramu *suhega ekstrakta šentjanževke HRS*;
- *resolucija:* minimalno 2 med vrhoma psevdohipericina in hipericina.

Izračunaj odstotek vsebnosti celokupnih hipericinov, izraženih kot hipericin, po naslednji formuli:

$$\frac{(A_1 + A_2) \times m_2 \times p}{A_3 \times m_1}$$

A<sub>1</sub> = površina pod krivuljo psevdohipericina v kromatogramu testne raztopine;

A<sub>2</sub> = površina pod krivuljo hipericina v kromatogramu testne raztopine;

A<sub>3</sub> = površina pod krivuljo hipericina v kromatogramu referenčne raztopine;

m<sub>1</sub> = masa ekstrakta za pripravo testne raztopine, v gramih;

m<sub>2</sub> = masa *suhega ekstrakta šentjanževke HRS* za pripravo referenčne raztopine, v gramih;

p = odstotek vsebnosti hipericina v *suhem ekstraktu šentjanževke HRS*.

## **2. NAMEN DELA**

V okviru diplomske naloge bomo s HPLC metodo ugotavljali, kako matriks vzorca, ki ga je predstavljal dodatek ocetne kisline, trietilamina, mešanice in posameznih soli NaCl, MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> in CaCO<sub>3</sub>, vpliva na rezultate analize vzorca standarda ter ekstraktov šentjanževke. Pri preučevanju literature smo namreč ugotovili, da lahko dodane kisline, baze ali soli reagirajo z molekulo hipericina, posledično pa bi se lahko spremenil odziv molekule. Zato bomo opazovali, kako dodatki vplivajo na površino pod krivuljo (AUC) standarda hipericina in hipericina v ekstraktih šentjanževke.

V prvem delu bomo najprej poiskali optimalno metodo za pripravo ekstraktov. Sledila bo priprava vzorcev ter optimizacija HPLC metode za ločbo standarda ter ekstraktov in ugotovitev posameznih retencijskih časov.

V drugem delu bomo pričeli z ugotavljanjem vpliva matriksa na vzorce. Preverili bomo, kako na AUC vzorca vplivajo dodatek kisline, baze ter soli. V primeru, da bomo opazili spremembe, nas bo zanimalo, če so le-te reverzibilne. Preverili bomo, če na rezultate analize vpliva tudi tip viale, v kateri izvajamo analizo. Za morebitne ugotovljene spremembe bomo s pomočjo podatkov iz literature poskusili poiskati ustrezne razlage. Na koncu bomo dobljene rezultate primerjali s farmakopejsko monografijo za kvantifikacijo suhega ekstrakta šentjanževke in ugotavljali, ali bi to monografijo lahko še izboljšali.

### **3. MATERIALI IN METODE**

#### **3.1. Materiali**

##### **3.1.1. Rastlinski material**

Pri delu smo uporabili zel šentjanževke (*Hypericum perforatum*). Šentjanževko smo v času cvetenja (maj in junij 2012) nabrali na šestih različnih lokacijah: Ljubljana – Bežigrad, Ljubljana – Šiška, Mrzlica, Sevnica, Ribnica in Žalec. Sledilo je sušenje na suhem pri sobni temperaturi 1 teden, nato smo posušeno zel uporabili za pripravo ekstraktov.

##### **3.1.2. Reagenti in topila**

Topilo za ekstrakcijo: metanol (Carlo Erba (Milano, Italija), Panreac (Barcelona, Španija)).

Topila za HPLC:

- acetonitril HPLC (Panreac (Barcelona, Španija)),
- acetonitril HPLC, gradient grade ( J.T. Baker (Deventer, Nizozemska)),
- acetonitril HPLC, ultragradient grade ( J.T. Baker (Deventer, Nizozemska)),
- metanol (Carlo Erba (Milano, Italija), Panreac (Barcelona, Španija)),
- trifluorocetna kislina (Roth (Karlsruhe, Nemčija)),
- voda HPLC (Panreac (Barcelona, Španija)).

Mobilne faze za HPLC:

- MF A = voda + acetonitril (2,5 %) + TFA (0,1 %),
- MF B = acetonitril + voda (2,5 %) + TFA (0,1 %).

Standard: hipericin (PhytoLab, Nemčija).

##### **3.1.3. Aparature**

Tehtanje: tehtnica Kern ALS 120 – 4, tehtnica Mettler PC 2000.

Naprava za mletje droge: mlinček Blender 8010EB model HGBTWT (Waring Commercial, ZDA).

Ultrazvočna kad: Bandelin Sonorex Digitec.

Centrifugiranje: centrifuga Centric 400R, Tehnica.

HPLC (Shimadzu Corporation, Japonska):

- sistem UFCL XR Shimadzu 20AD XR,
- detektor Diode Array SPD-M20A,
- fluorescenčni detektor RF-10A XL,
- računalniški program LC Solution Shimadzu 1.24 SP1,
- kolona (RP - C18): Ascentis (Ascentis Express C18, 10x4,6 mm, 2,7 µm).

Material, uporabljen za pripravo vzorcev za HPLC:

- injekcijske brizge (5 mL),
- injekcijske igle,
- steklene viale (2 mL),
- filtri za injekcijske brizge: disk filter Q-Max RR Syringe Filter, premer = 25 mm, velikost por = 0,45 ter 0,22 µm,
- pH lističi (pH-indicator strips pH 0-14, Merck).

Viale:

- temna viala brez inserta, Supelco SU-860033, Sigma Aldrich,
- temna viala z dodanim insertom, Supelco SU-854110, Sigma Aldrich,
- temna viala z vgrajenim insertom, Chromacol Fixed Insert Vial 03-FIRV(A),
- prozorna viala brez inserta, Supelco SU-854165, Sigma Aldrich.

Dobavitelja temnih vial in insertov smo zaprosili za podatke o tipu stekla. Vse viale in inserti proizvajalca Supelco so iz hidrolitičnega stekla tipa 1, ki je trdno in zelo dobro odporno na kisle, nevtralne in šibko bazične raztopine (33). Podatkov o tipu stekla temnih vial z vgrajenim insertom žal nismo dobili.

Drugo: terilnica, pestilo, erlenmajerice, bučke, čaše, plastične epruvete, steklene palčke, čolnički in steklene pipete.

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. HPLC**

Pred vsako HPLC analizo smo pripravljeni vzorec s pomočjo brizge s filtrirnim nastavkom s porami  $0,45 \mu\text{m}$  prefiltrirali v HPLC vialo. Sledila je analiza, ki je potekala pri  $T = 40^\circ\text{C}$ . Pri vsaki HPLC analizi smo na kolono injicirali  $5 \mu\text{l}$  vzorca.

### **3.2.2. Priprava ekstraktov šentjanževke**

#### **3.2.2.1. Ekstrakcija 1**

Cvetove in liste šentjanževke smo odtrgali s stebel, jih dali v terilnico ter zdrobili s pestilom. 1 g zdrobljene droge smo natehtali v plastično epruveto, ji dodali 10 ml MeOH ter jo zaščitili pred svetlobo. Sledila je ekstrakcija na ultrazvoku, ki je trajala 15 min. Nato smo vzorec centrifugirali 5 min pri 3000 rpm,  $T = 25^\circ\text{C}$ . Uporabili smo supernatant.

#### **3.2.2.2. Ekstrakcija 2**

Cvetove in liste šentjanževke smo ostrgali v mlinček ter zmleli. 1 g zmlete droge smo natehtali v plastično epruveto, dodali 10 ml MeOH in jo zaščitili pred svetlobo. Nato smo vzorec 30 min ekstrahirali na ultrazvoku, sledilo je centrifugiranje 5 min pri 3000 rpm,  $T = 25^\circ\text{C}$ . Uporabili smo supernatant.

## 4. EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1. Analiza standarda hipericina

#### 4.1.1. Razvoj HPLC metode za analizo standarda hipericina

Preden smo lahko pričeli z analizo standarda hipericina smo morali najprej poiskati najoptimalnejšo metodo. Pri iskanju takšne metode smo spremenjali čas analize ter gradient MF B, kot je razvidno iz preglednice I:

**Preglednica I: Razvoj HPLC metode za analizo standarda**

metoda: <b>standard Hyp1</b> , čas analize: 20 min, pretok: 2 mL/min				
Čas (min)	0,01	15,00 – 20,00		
Gradient (% MF B)	40	100		
metoda: <b>st.hipericina</b> , čas analize: 15 min, pretok: 2 mL/min				
Čas (min)	0,01	10,00 – 12,00	12,01 – 15,00	
Gradient (% MF B)	40	100	40	
metoda: <b>st.hipericina RID</b> , izokratska ločba, čas analize: 6 min, pretok: 2 mL/min				
Čas (min)	0,01 – 6,00			
Gradient (% MF B)	70			

#### 4.1.2. Analiza standarda hipericina na HPLC v odvisnosti od različnih dodatkov

Zanimalo nas je, ali se AUC, ki ga dobimo pri detekciji vzorca standarda hipericina na detektorju pri valovni dolžini 590 nm, spreminja v odvisnosti od pH vzorca ali dodatka soli. V vzorec standarda smo dodajali različne količine ocetne kisline, trietylamina (TEA) in soli ter primerjali AUC. Pri vseh analizah smo uporabili temne viale z dodanim insertom, analizo pa smo izvedli z metodo »st.hipericina RID«.

##### 4.1.2.1. Priprava osnovne raztopine standarda

$$m (\text{stand.}) = 0,92 \text{ mg}$$

$$V (\text{MeOH}) = 9 \text{ ml}$$

$$C (\text{stand.}) = 0,1 \text{ mg/ml}$$

Standard smo zatehtali v čolniček in ga v stekleni posodici raztopili v MeOH. Ker se po dodatku MeOH standard še ni popolnoma raztopil, smo ga dali na ultrazvok za približno 5

min, nato je sledila analiza.

#### 4.1.2.2. Dodatek ocetne kisline

Najprej smo pripravili osnovno raztopino ocetne kisline. V 5 ml bučko smo dali 0,5 ml ocetne kisline in z MeOH dopolnili do oznake. Tako smo dobili osnovno raztopino ocetne kisline, ki je vsebovala 0,1 ml ocetne kisline/ml raztopine oziroma 0,1 µl ocetne kisline/µl raztopine.

V viale smo pripravili 200 µl vzorca po postopkih iz preglednice II:

Preglednica II: Sestava vzorcev z dodatkom ocetne kisline.

Ime vzorca	V (standard) [µl]	V (osnovna razt. ocetne kisline) [µl]	V (MeOH) [µl]
0,125 % oc.ksl.	100	2,5	97,5
0,25 % oc. ksl.	100	5	95
0,5 % oc. ksl.	100	10	90
0,75 % oc.ksl.	100	15	85
0,9 % oc. ksl.	100	18	82
1 % oc. ksl.	100	20	80
2,5 % oc. ksl.	100	50	50

Pripravili smo tudi vzorec »25 % oc. ksl.«, ki je bil sestavljen iz 100 µl standarda, kateremu smo dodali 50 µl neredčene brezvodne ocetne kisline ter 50 µl metanola.

#### 4.1.2.3. Dodatek trietilamina

Najprej smo pripravili osnovno raztopino TEA. V 5 ml bučko smo dali 0,5 ml TEA in z MeOH dopolnili do oznake. Tako smo dobili osnovno raztopino TEA, ki je vsebovala 0,1 ml TEA/ml raztopine oziroma 0,1 µl TEA/µl raztopine.

V viale smo pripravili 200 µl vzorca po postopkih iz preglednice III:

Preglednica III: Sestava vzorcev z dodatkom TEA.

Ime vzorca	V (standard) [µl]	V (osnovna razt. TEA) [µl]	V (MeOH) [µl]
1 % TEA	100	20	80
5 % TEA	100	100	0

Pripravili smo tudi vzorec »25 % TEA«, ki je bil sestavljen iz: 100 µl standarda, kateremu smo dodali 50 µl neredčenega TEA ter 50 µl metanola.

#### **4.1.2.4. Reverzibilnost dodatka kisline ali baze**

##### **a) dodatek kisline**

Vzorec, s katerim smo pomerili reverzibilnost dodatka kisline, smo pripravili po postopku, ki ga opisuje Preglednica IV:

**Preglednica IV: Sestava vzorca za test reverzibilnosti dodatka kisline.**

Ime vzorca	V (standard) [µl]	V (osnovna razt. oc.ksl.) [µl]	V (MeOH) [µl]	V (osnovna razt. TEA) [µl]
0,5 % oc.ksl + 1 % TEA	100	10	90	20

Najprej smo pripravili osnovni raztopini ocetne kisline (4.1.2.2.) ter TEA (4.1.2.3.). V vialo smo dali standard, ki smo mu dodali ocetno kislino ter MeOH in pomerili kinetiko v 60 min. Po 60 min smo v vialo dodali še 20 ul osnovne raztopine TEA in pomerili kinetiko v 30 min.

##### **b) dodatek baze**

Vzorec, s katerim smo pomerili reverzibilnost dodatka baze, smo pripravili po postopku, ki ga opisuje Preglednica V:

**Preglednica V: Sestava vzorca za test reverzibilnosti dodatka baze.**

Ime vzorca	V (standard) [µl]	V (osnovna razt. TEA) [µl]	V (MeOH) [µl]	V (osnovna razt. oc.ksl.) [µl]
0,5 % TEA + 1 % oc.ksl.	100	10	90	20

Najprej smo pripravili osnovno raztopino TEA (4.1.2.3.) ter ocetne kisline (4.1.2.2.). V vialo smo dali standard, ki smo mu dodali TEA ter MeOH in pomerili kinetiko v 60 min. Po 60 min smo v vialo dodali še 20 ul osnovne raztopine ocetne kisline in pomerili kinetiko v 30 min.

#### **4.1.2.5. Dodatek osnovnih raztopin in mešanic soli $\text{NaCl}$ , $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_x \times \text{H}_2\text{O}$ in $\text{CaCO}_3$**

##### **a) priprava 1% osnovne raztopine mešanice soli**

Najprej smo pripravili 1 % osnovno raztopino mešanice soli (1 g / 100 ml), katere sestavo prikazuje Preglednica VI:

**Preglednica VI: Zatehte posameznih soli za pripravo osnovne raztopine mešanice soli.**

<b>sol</b>	<b>m [g]</b>
NaCl	0,252
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,256
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_x \times \text{H}_2\text{O}$	0,254
$\text{CaCO}_3$	0,249

Vse soli smo natehtali v 100 ml bučko, z vodo dopolnili do oznake, dali na ultrazvok za 10 min ter prefiltrirali skozi filter s porami 0,22  $\mu\text{m}$ .

Vzorec, ki smo ga analizirali s HPLC, smo pripravili tako, da smo k 100  $\mu\text{l}$  standarda dodali 10  $\mu\text{l}$  osnovne raztopine soli ter 90  $\mu\text{l}$  MeOH. V 10  $\mu\text{l}$  raztopine soli je bilo 0,025 mg vsake soli, skupno torej 0,1 mg vseh soli.

##### **b) priprava 0,5 % osnovnih raztopin posameznih soli**

Osnovne raztopine posameznih soli smo pripravili tako, da smo v vsako 100 ml bučko zatehtali 0,5 g posamezne soli ter z vodo dopolnili do 100 ml (0,5 g / 100 ml), dali na ultrazvok za 5 min ter nato prefiltrirali skozi filter s porami 0,22  $\mu\text{m}$ . Vzorce, ki smo jih nato analizirali s HPLC, pa smo pripravili tako, da smo k 100  $\mu\text{l}$  standarda dodali 10  $\mu\text{l}$  posamezne raztopine soli ter 90  $\mu\text{l}$  MeOH. V 10  $\mu\text{l}$  raztopine soli je bilo 0,050 mg posamezne soli.

Posamezni 0,5 % osnovni raztopini smo s pH lističem pomerili pH in ugotovili sledeče vrednosti:

- $\text{NaCl}$ : pH = 7
- $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ : pH = 5
- $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_x \times \text{H}_2\text{O}$ : pH = 3 - 4
- $\text{CaCO}_3$ : pH = 8

##### **c) priprava 2 % osnovne raztopine mešanice soli**

V 100 ml bučko smo natehtali 0,5 g posamezne soli ter z vodo dopolnili do 100 ml. Tako smo

pripravili 2 % osnovno raztopino mešanice soli. 10 µl te osnovne raztopine smo dodali k 100 µl standarda in dodali še 90 µl MeOH. V 10 µl raztopine soli je bilo 0,050 mg vsake soli, skupno torej 0,2 mg vseh soli.

## 4.2. Analiza ekstraktov šentjanževke

### 4.2.1. Razvoj HPLC metode za analizo ekstraktov šentjanževke

Preden smo lahko pričeli z analizo ekstraktov, smo morali poiskati najoptimalnejšo metodo. Pri iskanju takšne metode smo spremenjali čas analize ter gradient MF B, kot je razvidno iz preglednice VII:

**Preglednica VII: Razvoj HPLC metode za analizo ekstraktov.**

metoda: <b>razvoj 1</b> , čas analize: 40 min, pretok: 2 ml/min				
Čas (min)	0,01	25	40	
Gradient (% MF B)	40	100	100	
metoda: <b>razvoj 2</b> , čas analize: 30 min, pretok: 2 ml/min				
Čas (min)	0,01	13,00	30,00	
Gradient (% MF B)	40	100	100	
metoda: <b>razvoj 3</b> , čas analize: 35 min, pretok: 2 ml/min				
Čas (min)	0,01	10,00	30,00	30,01 – 35
Gradient (% MF B)	40	100	100	40
metoda: <b>razvoj 4</b> , čas analize: 25 min, pretok: 2 ml/min				
Čas (min)	0,01	10,00	10,01 – 20,00	20,01 – 25,00
Gradient (% MF B)	50	80	100	50
metoda: <b>razvoj 5</b> , čas analize: 28 min, pretok: 2 ml/min				
Čas (min)	0,01	10,00	15,00 – 25,00	25,01 – 28,00
Gradient (% MF B)	30	60	100	30
metoda: <b>razvoj 6</b> , čas analize: 28 min, pretok: 2 ml/min				
Čas (min)	0,01	15,00	15,01 – 25,00	25,01 – 28,00
Gradient (% MF B)	50	80	100	50
metoda: <b>razvoj 7</b> , čas analize: 28 min, pretok: 2 ml/min				
Čas (min)	0,01 – 15,00	15,01 – 25,00	25,01 – 28,00	

Gradient (% MF B)	50	100	50	
metoda: <b>razvoj 8</b> , čas analize: 28 min, pretok: 2 ml/min				
Čas (min)	0,01	15,00	15,01 – 25,00	25,01 – 28,00
Gradient (% MF B)	50	60	100	50
metoda: <b>razvoj 9</b> , čas analize: 28 min, pretok: 2 ml/min				
Čas (min)	0,01	15,00	15,01 – 25,00	25,01 – 28,00
Gradient (% MF B)	50	70	100	50

#### 4.2.2. Priprava različnih ekstraktov šentjanževke

Po ekstrakciji, ki je opisana v točki 3.2.2.2., smo pripravili tri različne vzorce, ki smo jih nato analizirali na HPLC z metodo »razvoj 8«. Pri vseh analizah smo na kolono injicirali 5 µl neredčenega ekstrakta:

- 1.) Po ekstrakciji na ultrazvoku smo vzorce prefiltrirali v prozorno vialo brez inserta, jih pustili na svetlobi 20 min ter analizirali.
- 2.) Po ekstrakciji na ultrazvoku smo drogo postavili v temno omaro ter jo še 48 h macerirali v MeOH, centrifugirali in supernatant prefiltrirali v prozorno vialo brez inserta.
- 3.) Ko smo vzorce, ki so bili svetlobi izpostavljeni 20 min, analizirali, smo vzorce v prozornih vialah brez dodanega inserta izpostavili sončni svetlobi še za nadaljnjih 48 h.

Prav tako smo pomerili AUC v vzorcih, ki so bili pripravljeni iz 100 µl posameznega ekstrakta, ki je bil 48 h izpostavljen svetlobi ter 100 µl MeOH.

#### 4.2.3. Dodatek trietilamina

V temne viale z dodanimi inserti smo pripravili vzorce, ki so vsebovali 100 µl posameznega ekstrakta, ki je bil 48 h izpostavljeni sončni svetlobi, 50 µl neredčenega TEA ter 50 µl MeOH. Vzorce smo nato najprej analizirali na HPLC ob času t = 0 min, 90 min ter 180 min, nato pa smo vzorec, ki je vseboval ekstrakt šentjanževke, nabранi na Mrzlici, analizirali še ob časih t = 0 min, 30 min, 60 min, 90 min ter 120 min. Po tej analizi smo v isti vzorec dodali še 50 µl ocetne kisline, da bi preverili reverzibilnost sprememb, ki smo jih opazili. Pri vseh HPLC analizah smo uporabili metodo »razvoj 8«.

#### **4.2.4. Dodatek ocetne kisline**

V temne viale z dodanimi inserti smo pripravili vzorce, ki so vsebovali 100 µl posameznega ekstrakta, ki je bil 48 h izpostavljeni sončni svetlobi, 50 µl ocetne kisline ter 50 µl MeOH. Vzorce smo na HPLC analizirali ob časih t = 0 min, 30 min, 60 min, 90 min ter 120 min. Pri vseh HPLC analizah smo uporabili metodo »razvoj 8«.

#### **4.2.5. Dodatek 1 % raztopine mešanice soli NaCl, MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O, Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>) ×H<sub>2</sub>O in CaCO<sub>3</sub>**

Pripravili smo vzorce, ki so vsebovali ekstrakte z dodatkom 1 % raztopine soli, ki smo jo pripravili v točki 4.1.2.5. a). Vzorce smo pripravili tako, da smo v temno vialo z dodanim insertom dodali 100 µl posameznega ekstrakta, ki je bil 48 h izpostavljen sončni svetlobi, 10 µl 1 % osnovne raztopine mešanice soli ter 90 µl MeOH. Vzorce smo nato analizirali s HPLC z metodo »razvoj 8«.

### **4.3. Analiza vpliva steklovine na vzorce**

Pri analizi vpliva steklovine na AUC vzorcev smo uporabili različne viale, ki so se med sabo razlikovale po barvi, vsebnosti inserta ter v tem, ali smo jih predhodno sprali z MeOH ali ne. Pri analizi vpliva steklovine na AUC standarda hipericina smo izvedli dve seriji analiz – ena serija je potekala v vialah, ki jih predhodno nismo sprali z MeOH, ena serija pa v vialah, ki smo jih predhodno za 2 h namočili v MeOH (spiranje z MeOH). Po 2 h smo MeOH odlili, viale s fenom posušili do suhega ter v njih analizirali vzorec. Pri analizi vpliva steklovine pa smo izvedli le analize v vialah, ki niso bile sprane z MeOH.

#### **4.3.1. Vpliv na AUC vrednosti standarda hipericina**

Analizirali smo standard hipericina, ki smo ga pripravili v točki 4.1.2.1., z dodatkom MeOH. HPLC metoda, ki smo jo uporabili, je bila »st. hipericina RID«. Sestavo vzorcev prikazuje preglednica VIII:

**Preglednica VIII: Sestava vzorcev za analizo vpliva steklovine na AUC standarda hipericina.**

Ime vzorca	V (standarda) [ $\mu$ l]	V (MeOH) [ $\mu$ l]
Temna viala brez inserta	150	150
Temna viala z dodanim insertom	100	100
Temna viala z vgrajenim insertom	100	100
Prozorna viala brez inserta	150	150
Temna viala brez inserta (sprana z MeOH)	200	200
Temna viala z dodanim insertom (sprana z MeOH)	100	100
Temna viala z vgrajenim insertom (sprana z MeOH)	100	100
Prozorna viala brez inserta (sprana z MeOH)	150	150

#### **4.3.2. Vpliv na AUC vrednosti ekstraktov šentjanževke**

Analizirali smo ekstrakte, ki smo jih pripravili v točki 3.2.2.2. Vzorce smo pripravili tako, da smo jih prbl. 24 h pustili stati na dnevni svetlobi, nato pa smo jih pripravili po postopku, ki je opisan v preglednici IX. Za HPLC analizo smo uporabili metodo »razvoj 8«.

**Preglednica IX: Sestava vzorcev za analizo vpliva steklovine na AUC ekstraktov šentjanževke.**

Ime vzorca	V (ekstrakta) [ $\mu$ l]	V (MeOH) [ $\mu$ l]
Temna viala brez inserta	300	300
Temna viala z dodanim insertom	100	100
Temna viala z vgrajenim insertom	100	100
Prozorna viala brez inserta	300	300

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

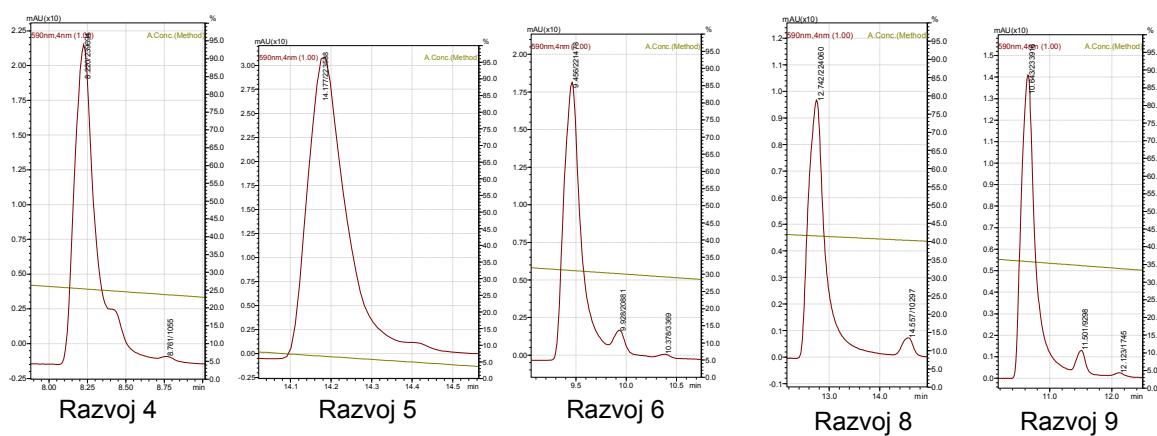
### 5.1. Optimizacija HPLC metode za analizo standarda

Za analizo standarda hipericina smo iskali metodo, ki bi ustreza našim potrebam. Potrebovali smo metodo, ki bi predvsem imela čim krajši čas analize, ob tem pa bi bil vrh hipericina še vedno ozek. Glavni vzrok za krajšanje časa analize je v tem, da bi pri zaporednih analizah vzorcev opravili analize v čim več časovnih točkah. Zato se je metoda »st.hipericina RID« izkazala za najprimernejšo, saj smo lahko vzorec analizirali vsakih 6 min, krajši čas analize pa je pomenil tudi manjšo porabo topil.

### 5.2. Optimizacija HPLC metode za analizo ekstrakta šentjanževke

Pri optimizaciji HPLC metode za analizo ekstrakta smo iskali metodo, ki bi dobro ločila vrh, ki pripada hipericinu, ob tem pa ne bi trajala predolgo. Iz slike 6 je razvidno, kako je pri različnih metodah uspela ločba vrha, ki pripada hipericinu.

Za ugotovitev  $t_r$  hipericina v ekstraktu šentjanževke smo najprej uporabili metodo »razvoj 3«, saj je za to analizo dala zadovoljive rezultate. V nadaljevanju pa smo videli, da ta metoda ni najoptimalnejša, saj smo s skrajšanjem metode na 28 min in spremembom gradiента (metoda »razvoj 8«) dobili še boljšo ločbo. Pri nadalnjih analizah ekstraktov smo tako uporabljali metodo »razvoj 8«.



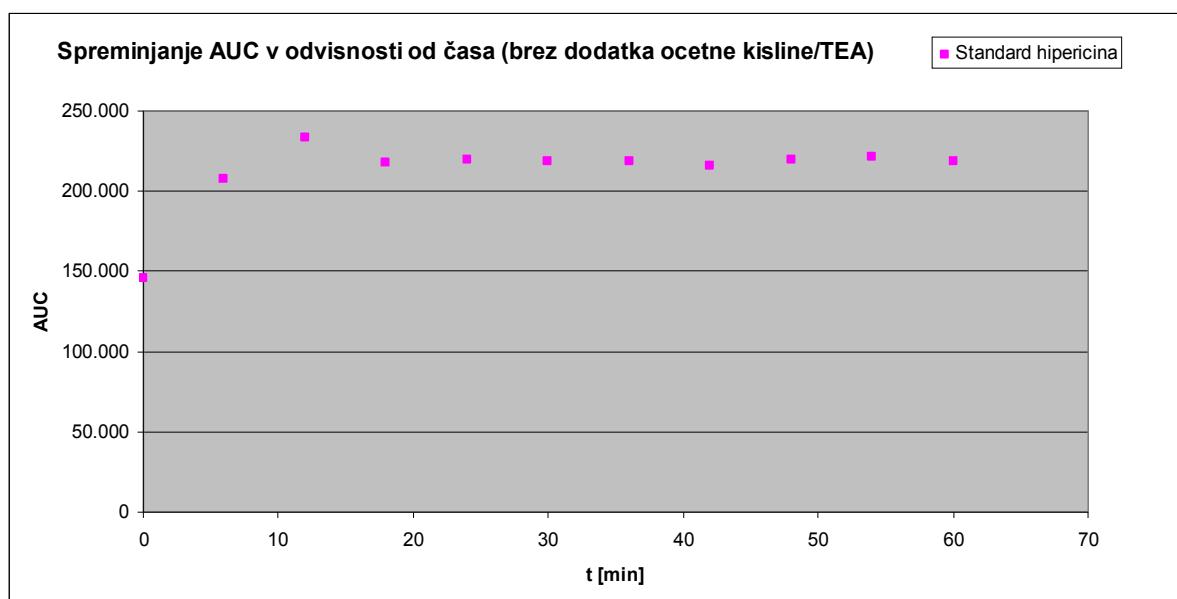
Slika 6: Spreminjanje kromatogramov pri optimizaciji metode za HPLC analizo ekstrakta šentjanževke, absorbanca pri  $\lambda = 590$  nm.

## 5.3. Analiza standarda hipericina

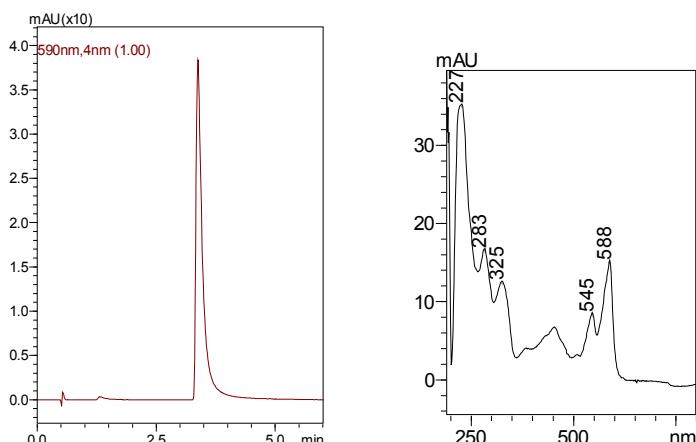
### 5.3.1. Spreminjanje AUC standarda hipericina brez dodatkov v odvisnosti od časa

Pri analizi vzorca standarda hipericina smo ugotovili, da dosežemo ponovljive rezultate zaporednih analiz šele po približno 20 min (slika 7). Pred analizo vzorca standarda je tako smiselno počakati vsaj 20 min, da so meritve ponovljive. Vzrok za naraščanje vrednosti AUC je lahko interakcija analita s steklom, najverjetneje s komponentami, ki se sproščajo iz stekla v vzorčno raztopino. To je lahko npr. sproščanje baze oziroma mineralov, ki se iz stekla sprostijo v raztopino in tam ostanejo.

Slika 8 (levo) nam prikazuje, kako izgleda kromatogram standarda hipericina v primeru, ko v vialo ne dodamo ocetne kisline ali TEA. Na sliki 8 (desno) pa je prikazan absorpcijski spekter standarda hipericina v UV in območju vidne svetlobe (VIS), kjer sta dobro vidna vrhova pri 545 in 588 nm. S pomočjo tega spektra smo pri vseh nadalnjih analizah določali, ali posamezen vrh pripada hipericinu ali kateri drugi spojini, ki bi lahko bila prisotna v ekstraktu ali pa je posledica razpada.



Slika 7: Spreminjanje AUC v odvisnosti od časa brez dodatka ocetne kisline ali TEA.



**Slika 8:** Levo: kromatogram standarda hipericina brez dodatka acetne kisline ali TEA, absorbanca pri  $\lambda = 590$  nm. Desno: absorpcijski spekter standarda hipericina v UV-VIS območju.

### 5.3.2. Dodatek acetne kisline

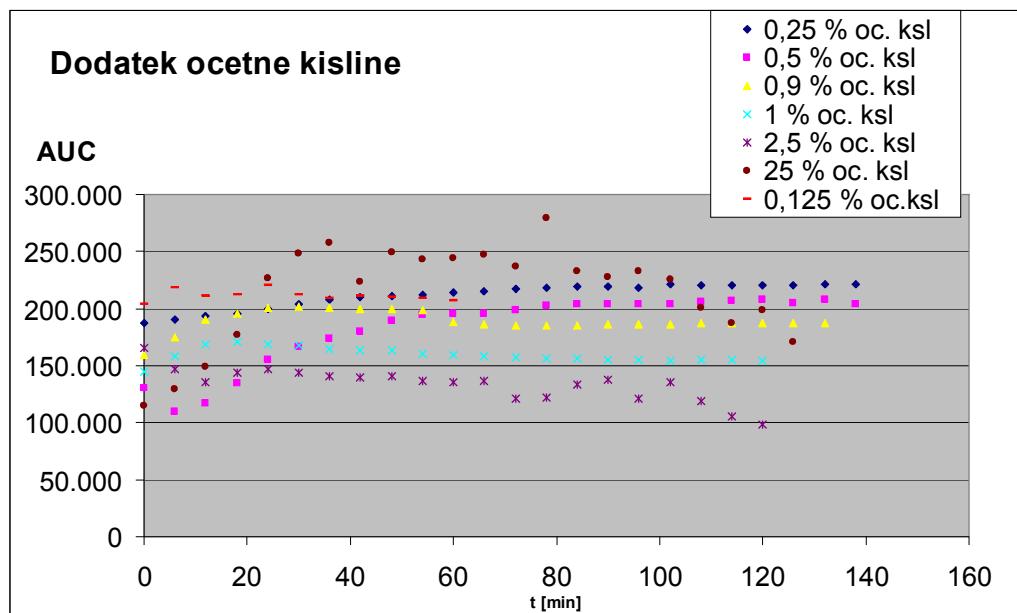
Pri analizi AUC standarda hipericina v odvisnosti od dodane acetne kisline smo ugotovili, da dodatek vpliva na AUC, AUC pa se s časom spreminja, zato ni vseeno, kdaj posnamemo kromatogram (slika 9). Pri vseh dodatkih smo ugotovili, da AUC pri analizi posameznega vzorca najprej narašča, nato pa se ustali in s časom prične padati. Če primerjamo vrednosti AUC ob dodatku kisline s tistimi brez dodatka, vidimo, da se s količino dodane kisline nižajo. Izjema so le vrednosti pri koncentraciji 25 % acetne kisline, saj bi te vrednosti pričakovali precej nižje, kot pa smo jih ugotovili (pod vrednostim pri koncentraciji 2,5 % acetne kisline). Dobljenega odstopanja nam ni uspelo pojasniti.

Vzrok za spremembo AUC v krajšem časovnem intervalu je verjetno posledica spremembe protonacije hipericina. Pri nižjih pH vrednostih pride namreč do protonacije molekule (22). H<sup>+</sup> protoni se vežejo na karbonilne skupine, to pa spremeni resonančno stabilizacijo. Zaradi tega bi se lahko spremenila valovna dolžina, pri kateri molekula absorbira oz. fluorescira, mi pa bi pri detekciji pri  $\lambda = 590$  nm v primerjavi s samim standardom opazili znižan odziv.

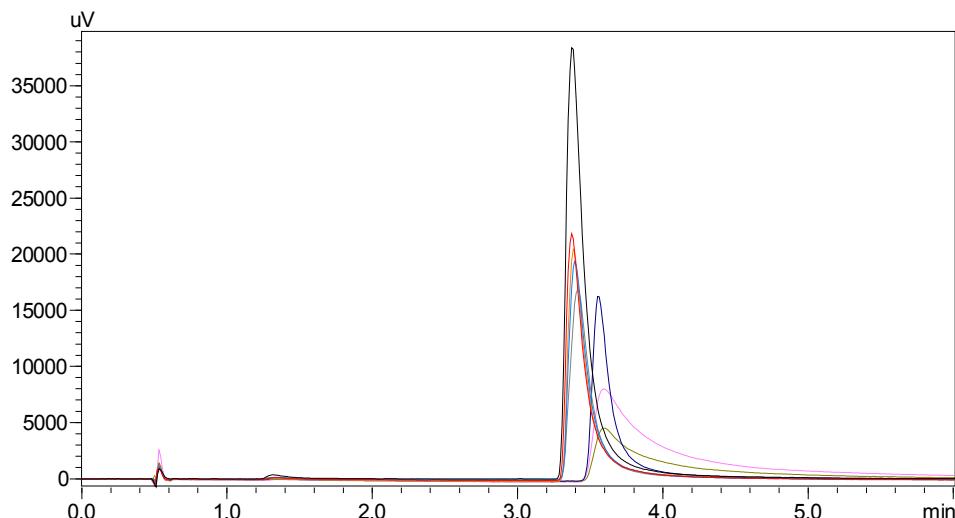
Ob času, ko je bil pri vseh vzorcih vzpostavljen plato (60 min), smo primerjali izgled kromatogramov, ki je prikazan na sliki 10. Vidimo, da dodatek kisline vpliva tudi na izgled kromatograma. Pri koncentracijah kisline do 0,9 % se je vrh, ki pripada hipericinu, znižal, pri koncentracijah 1 – 25 % pa smo opazili tudi premik vrha v desno, še dodatno pa se je znižala tudi njegova višina.

Za dosego platoja AUC vrednosti je tako potreben različen čas, variira pa tudi njegovo

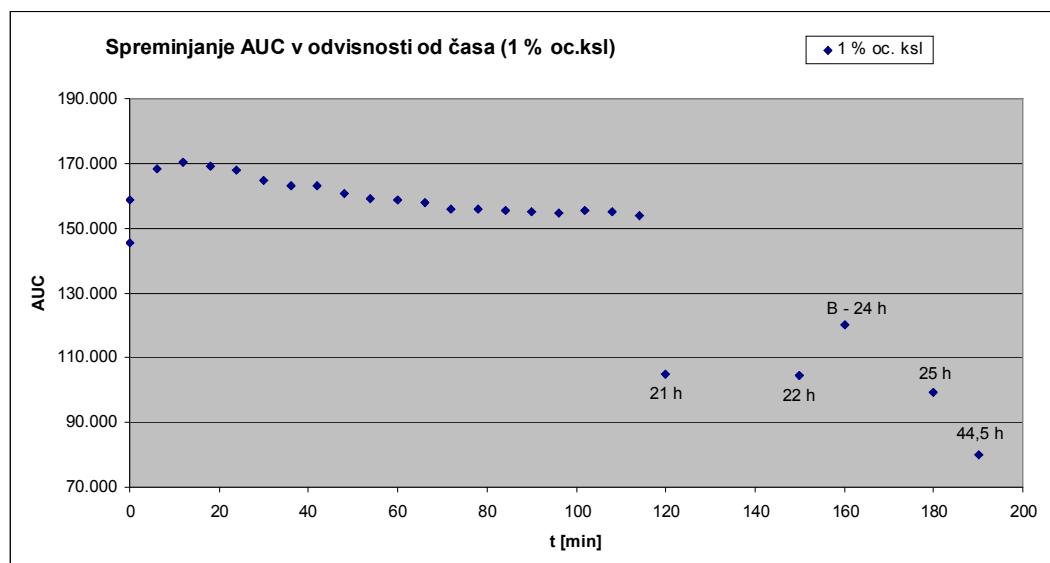
trajanje. V času, ko je pri nižjih koncentracijah ocetne kisline (npr. 0,5 % ali 0,25 %) še vzpostavljen plato, se pri višjih koncentracijah (npr. 2,5 % ali 25 %) AUC že zniža. Sklepali smo, da bi znižanje AUC v daljšem časovnem intervalu lahko bilo posledica razpada hipericina v kislem, kakor smo zapisali že v uvodu pri točki 1.2.2. To znižanje je še posebej dobro vidno na sliki 11, ki prikazuje spremenjanje AUC v odvisnosti od časa za vzorec »1 % oc. ksl«, kjer s časom AUC izrazito pade. Ker pri pregledu kromatogramov nismo našli novih vrhov, ki bi pripadali razpadnim produktom, sklepamo, da so nastale spojine, ki ne fluorescirajo oz. absorbirajo. Odstopanje točke B na sliki 11 je opisano v podpoglavlju 5.3.4.



Slika 9: Spreminjanje AUC standarda hipericina v odvisnosti od časa pri različnih koncentracijah ocetne kisline.



**Slika 10:** Kromatogram standarda hipericina ob različnih koncentracijah ocetne kisline ob času 60 min (absorbanca pri  $\lambda = 590$  nm): črna = brez dodatka, rdeča = 0,25 %, modra = 0,5 %, oranžna = 0,75 %, siva = 0,9 %, vijolična = 1 %, zelena = 2,5 %, roza= 25 %.

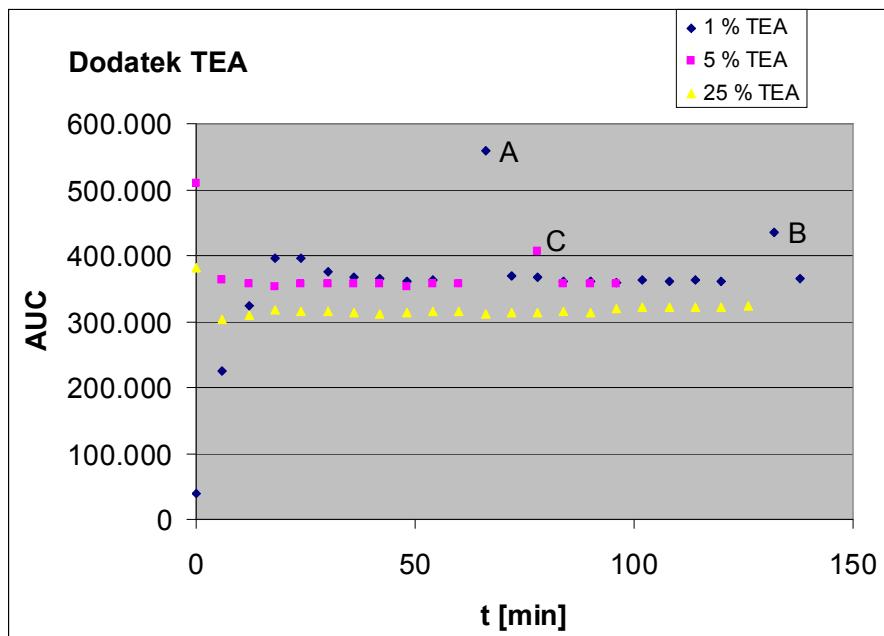


**Slika 11:** Spreminjanje AUC standarda hipericina v odvisnosti od časa, koncentracija ocetne kisline = 1 %. Točke na grafu od 120 min naprej predstavljajo analize po 21 h, 22 h, 24 h, 25 h in 44,5 h.

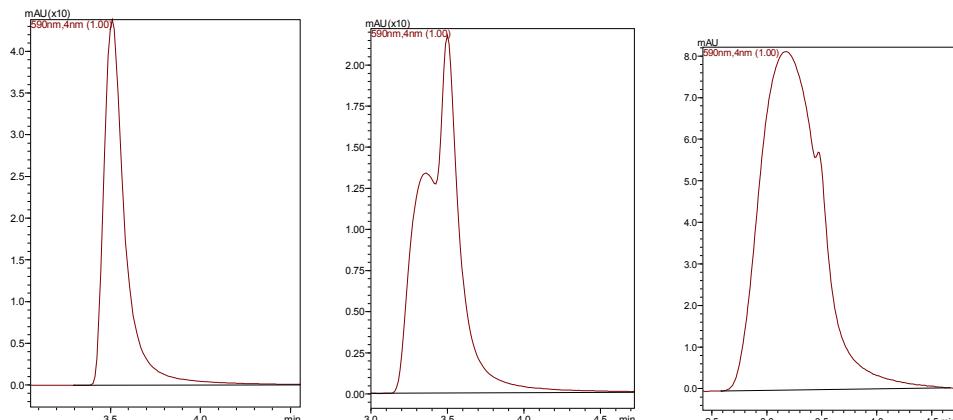
### 5.3.3. Dodatek trietylamina

Tudi pri analizi AUC v odvisnosti od dodanega TEA smo ugotovili, da dodatek vpliva na AUC, AUC pa se s časom spreminja in potrebuje nekaj časa, da se ustali (slika 12). Zaradi tega tudi v tem primeru ni vseeno, kdaj naredimo analizo. Odstopanje točk A, B in C na sliki 12 je opisano v naslednjem podoglavlju (5.3.4.). Opazili smo tudi, da je vrh standarda

hipericina ob večjih koncentracijah baze širši, v vrhu za hipericin pa opazimo še dodaten vrh, za katerega smo sklepali, da bi lahko pripadal neki novi obliki spojine hipericina (slika 13).



Slika 12: Sprememba AUC standarda hipericina v odvisnosti od časa pri različnih koncentracijah TEA.



Slika 13: Kromatogram standarda hipericina z dodatkom TEA (absorbanca pri  $\lambda = 590$  nm). Levo: dodatek TEA = 1 %, sredina: dodatek TEA = 5 %, desno: dodatek TEA = 25 %.

Da bi ugotovili, ali je širši vrh pri višjih koncentracijah baze posledica razpada hipericina ter nastanka nove spojine, smo primerjali absorpcijske spektre vseh treh vzorcev z absorpcijskim spektrom samega standarda hipericina brez dodatka. Ugotovili smo, da se absorpcijski spektri standarda hipericina v UV-VIS območju med sabo ujemajo v vseh točkah, tudi v novonastalih

vrhovih, zato sklepamo, da pri dodatku baze ne pride do nastanka nove spojine oziroma razpadnega produkta.

Kot smo zapisali že v uvodu, pri  $\text{pH} \geq 7$  pride najprej do deprotonacije na  $-\text{OH}$  skupinah na mestih 3 in 4, pri še višjih pH vrednostih pa pride do dodatne deprotonacije  $-\text{OH}$  skupin na mestih 1, 6, 8 ter 13. Ta deprotonacija je povezana s spremembami oblike absorpcijskega pasu, ki se razširi, pojavi pa se premik absorpcije k daljšim valovnim dolžinam. Ko smo v našem primeru primerjali absorpcijske spektre vzorcev z dodatkom TEA z absorpcijskimi spektimi istega standarda hipericina brez dodatka, omenjenih sprememb nismo opazili, saj so se absorpcijski spekti ujemali.

Sklepamo, da se AUC vrednosti vseeno spremenijo zaradi deprotonacije in spremenjene resonančne stabilizacije, vrednosti pa v primerjavi z vrednostmi standarda hipericina brez dodatka narastejo, spremeni pa se tudi izgled kromatografskega vrha, ki se razširi in deformira. Točnega vzroka za spremembo AUC vrednosti pa nismo uspeli ugotoviti.

#### **5.3.4. Drugi vplivi na spremembo AUC**

Zanimivost, ki smo jo opazili pri snemanju AUC pri vzorcu »1 % TEA« (slika 12), je bila, da sta točki, na grafu označeni z A (1 % TEA, 66 min) in B (1 % TEA, 132 min) precej izstopali. Preden se je na HPLC injiciral vzorec »1 % TEA, 66 min« - točka A, je bil analiziran vzorec s kislino (1 % oc. ksl., 24 h), enako smo pred analizo vzorca »1 % TEA, 132 min« - točka B, injicirali vzorec »1 % oc. ksl., 25 h«. Po analizi vzorca s kislino (1 % oc. ksl.) se kolona očitno ni dovolj dolgo spirala (uporabljeni metoda traja le 6 min), zato je nekaj kisline predvidoma ostalo na koloni, to pa je lahko vzrok za odstopanje točk A in B od platoja, kjer bi pričakovali njun odziv. To je verjetno tudi vzrok za odstopanje točke C (5 % TEA, 78 min). Pred to analizo smo namreč injicirali vzorec »1 % oc. ksl., 26,5 h«. Čeprav kislina vrednosti AUC načeloma zniža, pa smo v tem primeru opazili zvišanje AUC vrednosti.

Podobno obnašanje smo opazili tudi pri snemanju vzorca »1 % oc. ksl.« (slika 11). Ko smo opazovali spremembo AUC, smo ugotovili, da s časom prične padati, izrazito pa je bilo odstopanje pri točki B, pri kateri smo vzorec analizirali po 24 h, bil pa je injiciran takoj po injiciranju vzorca z bazo (1 % TEA, 54 min). Vidimo lahko, da je AUC v primerjavi z ostalimi analizami opazno narasel, kar je v skladu z rezultati, dobavljenimi pri dodatku baze v vzorec.

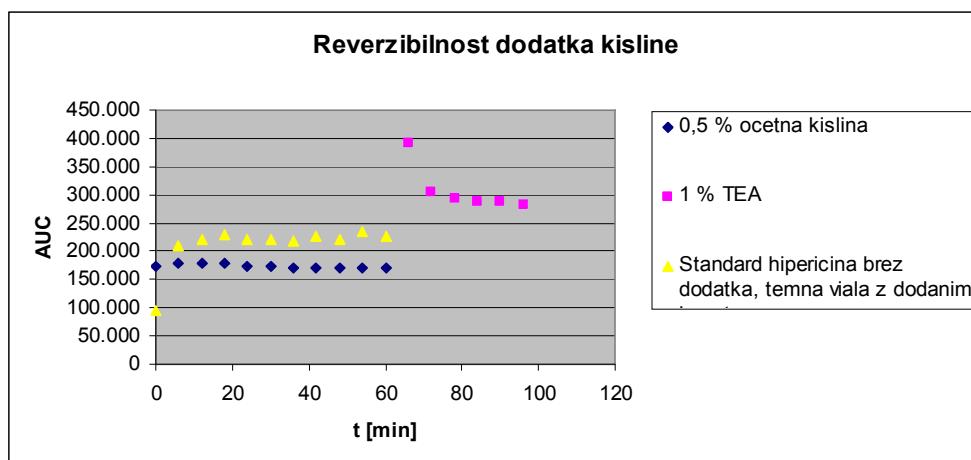
Iz navedenega lahko zaključimo, da moramo pred analiziranjem vzorcev, ki imajo dodano bazo ali kislino, kolono dobro sprati, saj lahko kisline ali baze, ki ostanejo na koloni iz predhodnih analiz, spremenijo vrednosti AUC.

### **5.3.5. Reverzibilnost AUC pri dodatku kisline ali baze**

Namen analiz vzorcev, ki smo jih pripravili v točki 4.1.2.4., je bil, da bi ugotovili, ali je dodatek kisline in baze v raztopino standarda reverzibilen. V primeru, da bi to držalo, bi po tem, ko smo v raztopino standarda dodali kislino, nadaljnji dodatek baze vrnil AUC na vrednost, ki jo ima standard hipericina brez dodatka kisline ali baze (kislina bi se nevtralizirala z dodano bazo). Podobno bi se pojavilo tudi pri dodatku baze, ki bi jo nato nevtralizirali z dodatkom kisline.

#### **a) Reverzibilnost AUC pri dodatku kisline**

Iz slike 14 vidimo, da dodatek TEA po prvotnem dodatku ocetne kisline AUC vrednosti ne vrne na vrednost, ki jo ima standard brez dodatka kisline ali baze. Vrednost AUC po dodatku TEA najprej strmo naraste, nato pa prične padati, nato pa se ustali nad vrednostjo, ki pripada AUC standarda brez dodatka kisline ali baze.

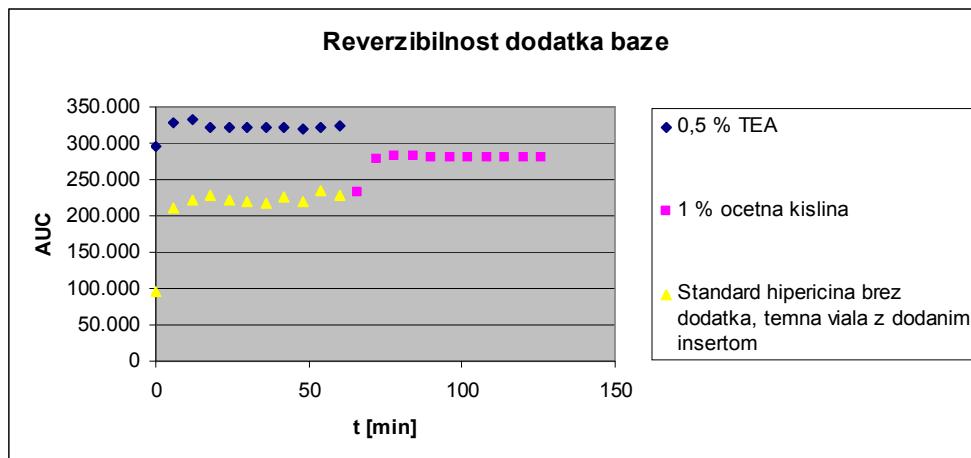


**Slika 14: Reverzibilnost AUC pri dodatku kisline: spremjanje AUC standarda ob dodatku 1 % TEA v vzorec, ki je vseboval 0,5 % ocetne kisline.**

#### **b) Reverzibilnost AUC pri dodatku baze**

Tudi v primeru, ko dodano bazo nevtraliziramo s kislino, so rezultati podobni. Iz slike 15 vidimo, da dodatek ocetne kisline po dodatku TEA AUC vrednosti ne vrne na vrednost, ki jo ima standard brez dodatka kisline ali baze. Po nevtralizaciji baze z ocetno kislino se vrednost

AUC najprej sicer res približa vrednosti, ki jo ima AUC standarda brez dodatka, a nato naraste.



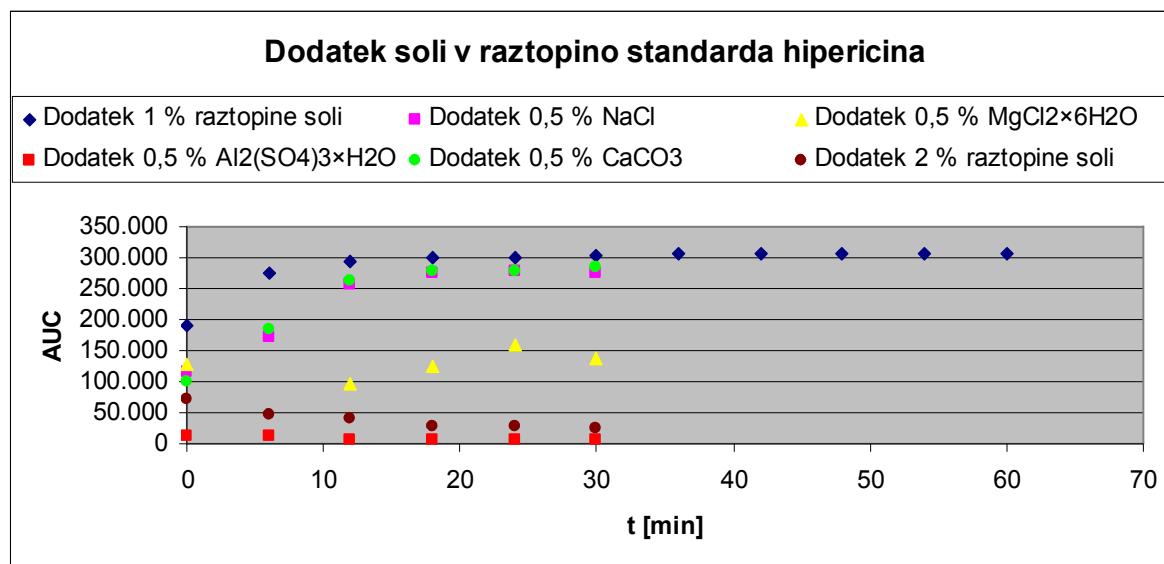
**Slika 15: Reverzibilnost AUC pri dodatku baze: sprememba AUC standarda ob dodatku 1 % ocetne kisline v vzorec, ki je vseboval 0,5 % TEA.**

Po teoriji, ki smo jo zapisali v uvodu, je sprememba AUC ob dodatku kisline ali baze posledica (de)protonacije molekule, zato bi pričakovali, da se bo po nevtralizaciji vrednost AUC vrnila na začetno vrednost, saj bo molekula v nevtralni obliki. Zanimivost, ki jo opazimo v obeh primerih, je, da vrednost AUC po nevtralizaciji naraste na podobno vrednost (okoli 275.000), ne glede na to, ali nevtraliziramo bazo s kislino ali obratno. Zanimalo nas je, če mogoče po nevtralizaciji s kislino ali bazo nastane nova spojina, zato smo primerjali kromatograme standarda brez dodatka s kromatogrami standarda po nevtralizaciji, prav tako pa smo primerjali še absorpcijske spektre vseh vzorcev. Ugotovili smo, da se kromatogrami po nevtralizaciji ne razlikujejo od kromatograma standarda brez dodatka, ujemali pa so se tudi absorpcijski spektri. Sklepamo, da tudi v tem primeru ni prišlo do nastanka nove spojine. Pri nevtralizaciji smo v vzorec namenoma dodali višjo koncentracijo kisline oziroma baze, da bi zagotovili popolno nevtralizacijo in sklepamo, da je ravno to vzrok za odstopanje. V primeru, ko smo vzorec nevtralizirali z bazo, smo vzorec očitno toliko naalkalili, da so se AUC vrednosti zvišale. V primeru, ko pa smo vzorec nevtralizirali s kislino, pa dobljeni rezultati niso čisto logični. Pričakovali bi, da bodo zaradi protonacije C=O skupin AUC vrednosti nižje od AUC vrednosti standarda brez dodatka, a se to ni zgodilo. Mogoče je, da smo vseeno dodali premajhno količino kisline, saj manjši padec AUC vrednosti sicer zaznamo, a so AUC

vrednosti še vedno precej višje, kot pa so bile v primeru samega dodatka 1 % ocetne kisline.

### 5.3.6. Dodatek osnovnih raztopin in mešanic soli $\text{NaCl}$ , $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times \text{H}_2\text{O}$ in $\text{CaCO}_3$

Po naši predpostavki je lahko vzrok za sprememjanje vrednosti AUC standarda hipericina tudi interakcija analita s steklom, najverjetneje s komponentami stekla (baze oziroma soli), ki se sproščajo v vzorčno raztopino. Zanimalo nas je, kako se spreminja AUC v primeru, ko v vzorce dodamo različne količine mešanice soli ali posameznih soli (vzorci pripravljeni v točki 4.1.2.5.). Rezultati HPLC analiz so prikazani na sliki 16.



Slika 16: Sprememba AUC standarda hipericina ob dodatkih soli.

#### a) dodatek 1 % osnovne raztopine mešanice soli

Vidimo, da dodatek 1 % osnovne raztopine mešanice soli vpliva na AUC, saj se je le-ta povišal ter se po približno 20 min ustalil na vrednosti okoli 300.000. Ker so AUC vrednosti samega standarda hipericina nižje (okoli 220.000), sklepamo, da je sprememba AUC verjetno posledica dodatka raztopine soli. Ker pa ne vemo, ali je ta sprememba posledica učinka ene soli ali pa je za to odgovorna mešanica več različnih soli, smo v nadaljevanju to preverili.

#### b) dodatek 0,5 % osnovnih raztopin posameznih soli

Na sliki 16 lahko vidimo, kako se spremeni AUC, ko v raztopino standarda dodamo osnovne raztopine posameznih soli. Ob dodatku  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times \text{H}_2\text{O}$  ter  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  se vrednosti AUC

precej znižajo (poimenovali smo ju »dušeče« soli), ob dodatku preostalih soli pa vidimo, da so vrednosti AUC malce nižje kot pa ob dodatku 1 % osnovne raztopine mešanice soli. Upoštevati moramo še to, da smo v tem primeru v raztopino standarda dodali 0,5 % posamezne soli, v točki a) pa 0,25 %. Vzrok za znižanje AUC pa očitno ni nastanek nove strukture, kot smo sprva domnevali. Vsi kromatogrami, ki smo jih dobili po dodatkih posameznih raztopin soli, se namreč ujemajo s kromatogramom standarda hipericina, prav tako pa se ujemajo tudi absorpcijski spektri. Očitno posamezne soli, ki močno znižajo AUC, močneje dušijo odziv kot pa soli, pri katerih AUC ni toliko nižji.

### c) dodatek 2 % osnovne raztopine mešanice soli

Na sliki 16 lahko vidimo, da tudi dodatek 2 % osnovne raztopine mešanice soli vpliva na AUC standarda hipericina. AUC vrednost se izrazito zniža, kar je zanimivo, saj se ne ujema z rezultati ob dodatku 1 % osnovne raztopine, kjer smo opazili naraščanje AUC vrednosti. Tudi to znižanje ni posledica razpada hipericina in nastanka nove strukture, saj sta dobljena kromatogram ter absorpcijski spekter enaka kromatogramu in absorpcijskemu spektru samega standarda hipericina. Sklepamo, da tudi v tem primeru pride do dušenja odziva, ki je očitno posledica dodanih soli. Ker so se AUC vrednosti v primerjavi z AUC vrednostmi pri dodatki 1 % raztopine soli zelo močno znižale, sklepamo, da smo dodali že dovolj visoke koncentracije »dušečih« soli. Pri dodatku 1 % raztopine so bile koncentracije »dušečih« soli očitno tako nizke, da do dušenja ni prišlo oziroma so prevladali »spodbujevalni« učinki drugih soli.

Vidimo, da na spremembo AUC ob dodatku soli vplivata koncentracija in vrsta soli, zato moramo ta faktorja ob analizi upoštevati. Kot smo zapisali že v uvodu, je mogoče, da hipericin z določenimi tipi soli tvori aggregate oz. komplekse, kar vpliva na fluorescenco ter absorbanco, ki se znižata, zaradi tega pa se zniža tudi AUC. Očitno pa je tvorba agregatov odvisna od tipa in koncentracije soli, ki reagira s hipericinom. Sklepamo pa, da so za spremembe AUC vrednosti odgovorne tudi acidobazične lastnosti soli. Ko smo dodali soli, katerih raztopina je imela nižji pH ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  in  $\text{MgCl}_2$ ), so se vrednosti AUC znižale, pri dodatku soli z nevtralnim oz. bazičnim pH-jem ( $\text{NaCl}$  ter  $\text{CaCO}_3$ ) pa so se vrednosti zvišale. Glede na to, da ima spremembu pH vpliv na AUC vrednosti, sklepamo, da soli verjetno delujejo na enak način kot pa dodatek ocetne kisline ali TEA. Opazili pa smo, da se

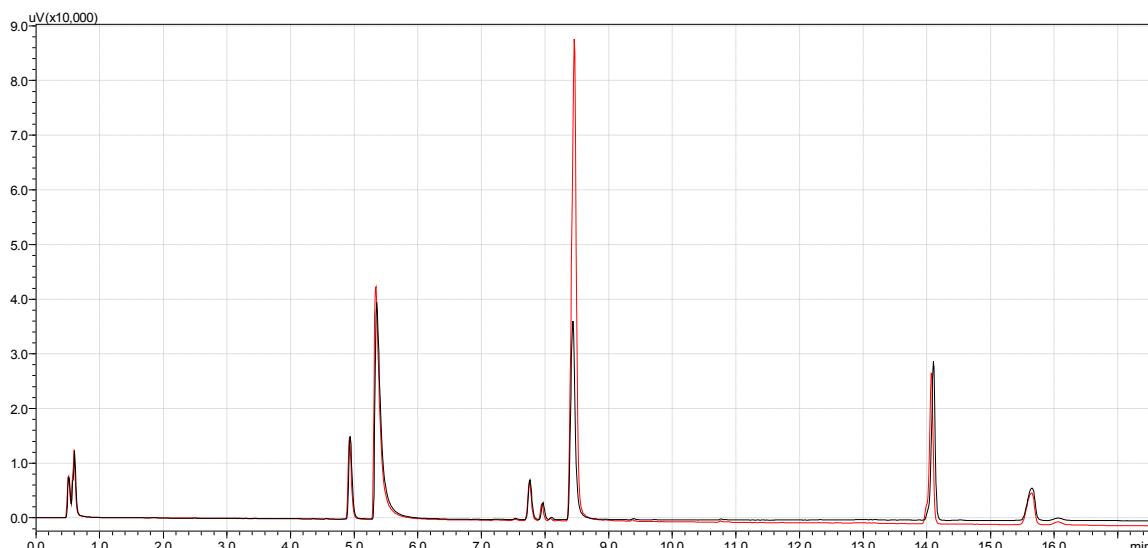
spremembe pri dodatku soli pojavijo hitreje. Začetek platoja smo namreč opazili že po približno petnajstih minutah, ob dodatku raztopine soli z nižjo pH vrednostjo pa je bil padec AUC večji, kot pa pri kateremkoli dodatku ocetne kisline. Hitrejše spremembe v raztopinah soli bi se lahko zgodile hitreje zaradi dejstva, se v raztopinah kislin in baz le-te porabljajo v protolitskih reakcijah s hipericinom, zato traja nekaj časa, da se sistem umiri. Pri dodatku raztopin soli pa le-te delujejo kot pufrski sistemi, zato spremembe opazimo hitreje.

Naše mnenje je, da je pri dodatku raztopin soli za spremembo AUC vrednosti potrebno upoštevati tako sposobnost tvorbe agregatov kot tudi acidobazične lastnosti raztopin, saj ta dva pojava nista izključujoča.

## **5.4. Analiza ekstraktov šentjanževke**

### **5.4.1. Ugotavljanje retencijskega časa hipericina v ekstraktu šentjanževke**

Ekstrakt »Ribnica«, ki smo ga pripravili po postopku pri točki 3.2.2.2., smo z metodo »razvoj 3« analizirali na HPLC. Kot rezultat smo dobili kromatogram, ki ga prikazuje slika 17 (črno). Ker smo dobili več vrhov, nismo bili prepričani, kateri vrh pripada hipericinu in kateri vrh ostalim spojinam v šentjanževki. Zaradi tega smo se odločili, da poleg ekstrakta v vialo dodamo še standard hipericina. Ponovno smo dobili več vrhov (slika 17, rdeče). Ker se je ob dodatku standarda povišal le vrh s  $t_r$  8,4 min, smo ugotovili, da se hipericin iz kolone eluira pri tem času. To smo potrdili tudi s primerjavo absorpcijskih spektrov, kjer smo primerjali vrh hipericina v ekstraktu brez dodatka standarda ter vrh samega standarda hipericina in ugotovili, da se absorpcijska spektra ujemata.



**Slika 17:** Določanje vrha, ki pripada hipericinu, HPLC metoda: »razvoj 3«. Črno: kromatogram ekstrakta šentjanževke brez dodatka standarda (absorbanca pri  $\lambda = 590$  nm). Rdeče: kromatogram ekstrakta šentjanževke z dodatkom standarda hipericina (absorbanca pri  $\lambda = 590$  nm).

Ekstrakte smo v nadaljevanju analizirali z metodo »razvoj 8«, ki je hitrejša, zato smo s to metodo še enkrat analizirali tudi standard hipericina. Zaradi spremenjenega gradiента mobilnih faz se namreč lahko spremeni tudi retencijski čas spojine. Da smo lahko z gotovostjo trdili, kateri vrh pripada hipericinu, smo analizo ponovili in ugotovili, da se je hipericin eluiral pri  $t_r = 13,0$  min.

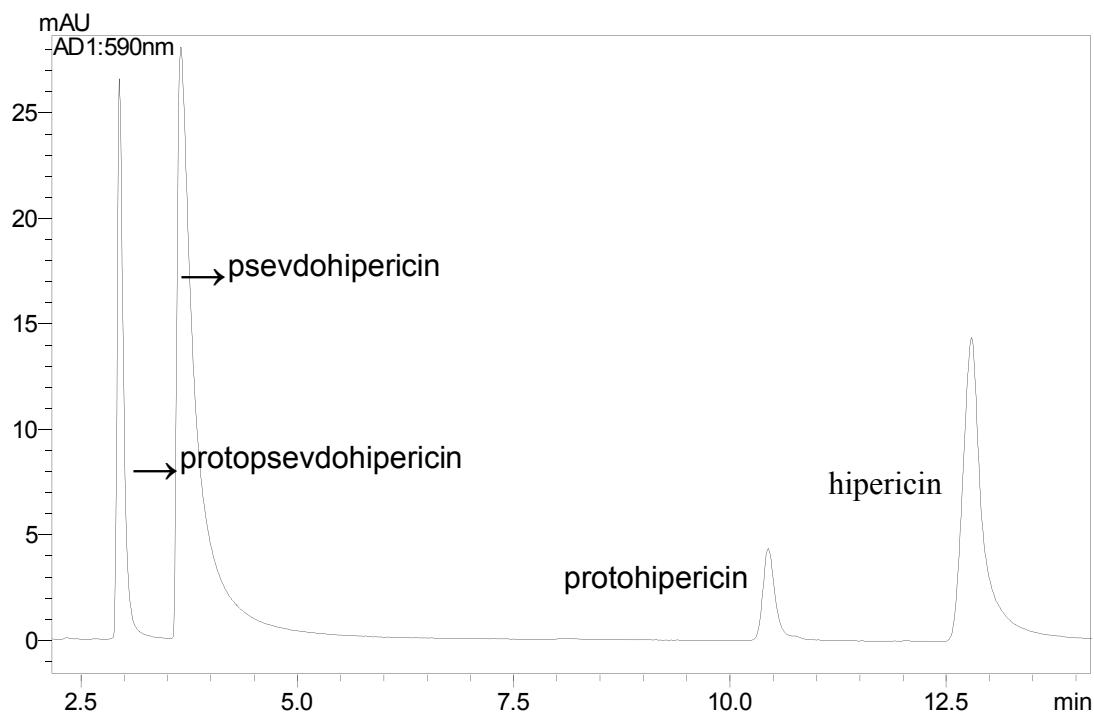
#### 5.4.2. Ugotavljanje retencijskih časov ostalih hipericinov v ekstraktu šentjanževke

Pri ločbi z metodo »razvoj 8« smo za spojine v ekstraktu ugotovili sledeče retencijske čase, za katere smo sklepali, da pripadajo hipericinom:

- spojina 1 – 12,8 min,
- spojina 2 – 10,4 min,
- spojina 3 – 3,6 min,
- spojina 4 – 2,9 min.

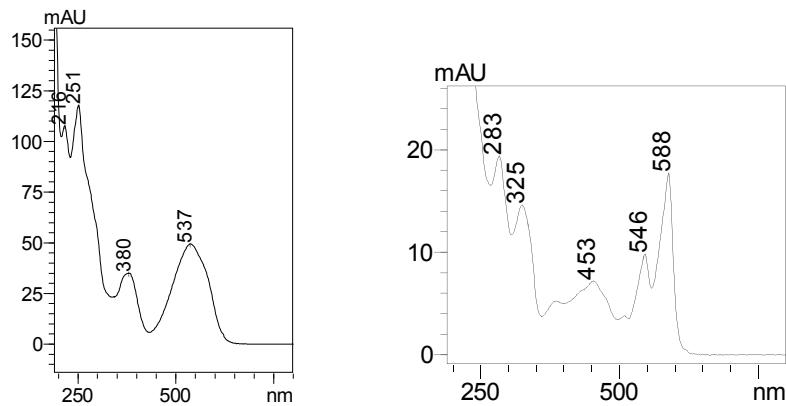
Za spojino 1 smo že pri prejšnji točki (5.4.1.) ugotovili, da njen vrh pripada hipericinu. Po dinamiki ločbe, ki smo jo opisali v uvodu (točka 1.3.3.) pa sklepamo, da se je pred vrhom hipericina izločil protohipericin, pred vrhom psevdohipericina pa protopsevdohipericin. Iz tega lahko sklepamo, da je vrh spojine 2 pripadal protohipericinu, vrh spojine 3

psevdohipericinu ter vrh spojine 4 protopsevdohipericinu, kar vidimo tudi na sliki 18.

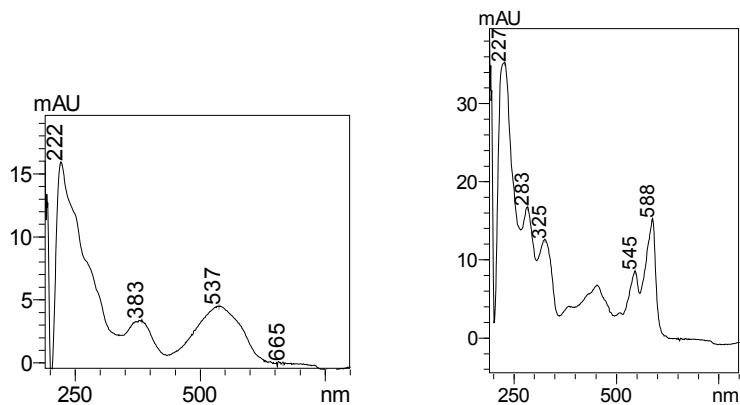


**Slika 18:** Prikaz ločbe hipericinov v ekstraktu šentjanževke s HPLC metodo »razvoj 8« (kromatogram pri  $\lambda = 590$  nm).

Posneli smo tudi absorpcijske spektre hipericinov, ki so prikazani na slikah 19 in 20. Ti spektri so se ujemali z literurnimi podatki (20, 34) in so nam pri nadalnjih analizah služili kot dodatna pomoč, s katero smo lahko potrdili, katera spojina se izloči pri določenem  $t_r$ . S pomočjo spektrov pa smo tudi ugotavljali, ali je tekom analiz prišlo do pretvorbe ene oblike hipericinov v drugo ali pa do tvorbe povsem nove spojine z drugačnim absorpcijskim spektrom.



Slika 19: Levo: absorpcijski spekter protopsevdohipericina, posnet v UV-VIS območju. Desno: absorpcijski spekter psevdohipericina, posnet v UV-VIS območju.



Slika 20: Levo: absorpcijski spekter protohipericina, posnet v UV-VIS območju. Desno: absorpcijski spekter hipericina, posnet v UV-VIS območju.

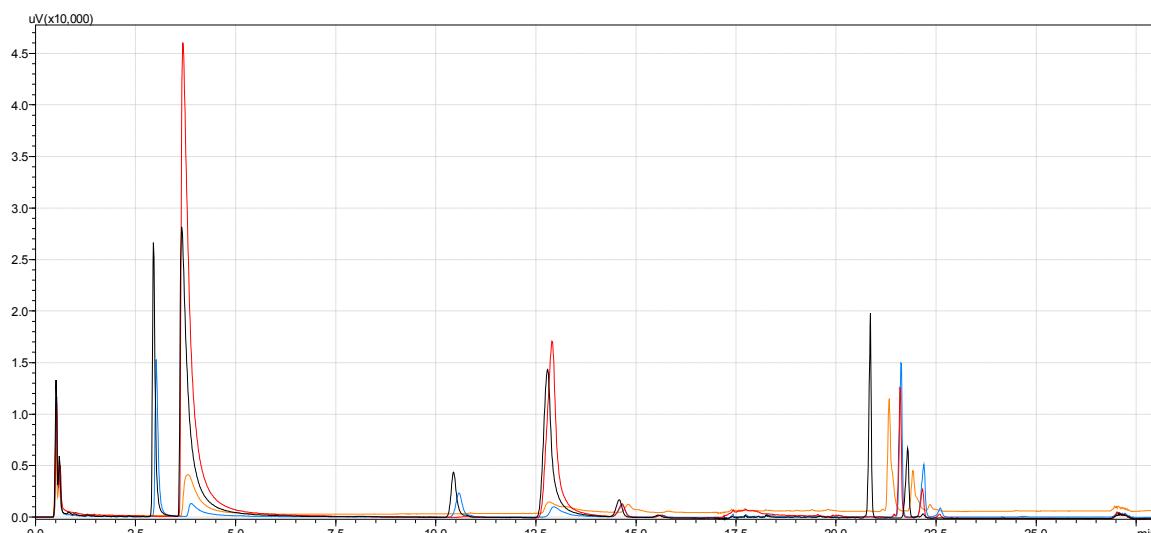
#### 5.4.3. Vpliv različnih metod ekstrakcije na vsebnost hipericinov

V eksperimentalnem delu (točka 4.3.2.) smo uporabili 3 različne metode ekstrakcije. Ugotovili smo, da ni vseeno, kako pripravimo ekstrakt šentjanževke, saj različni pogoji vplivajo na vsebnost hipericinov, ki smo jih analizirali z metodo HPLC (slike 22 – 25).

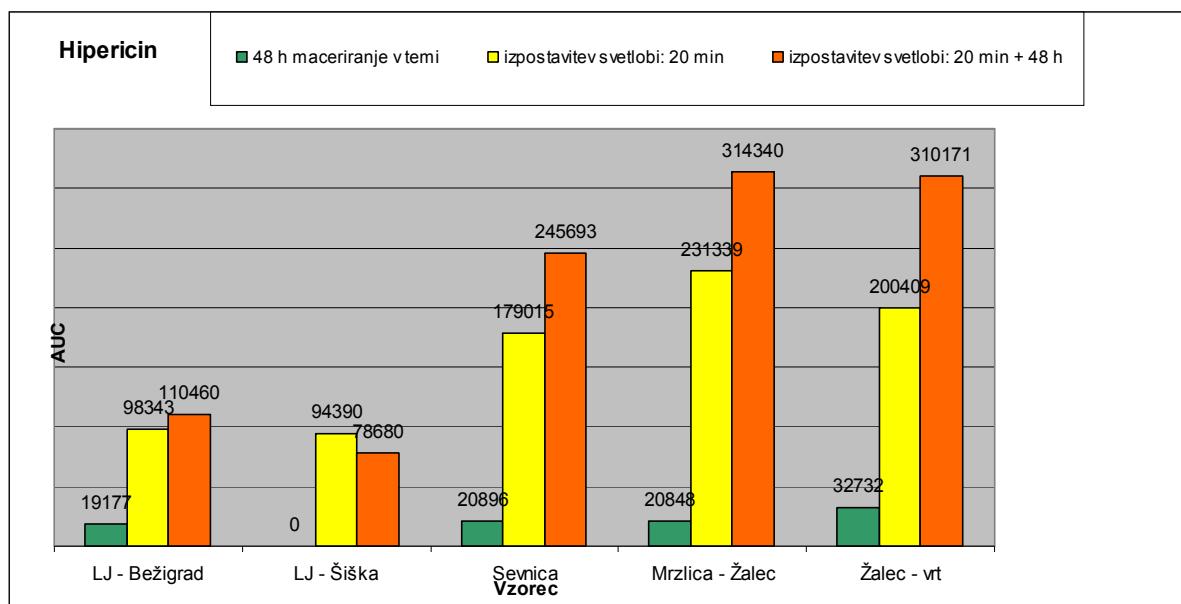
Pri metodi, ko smo ekstrakt po obdelavi v ultrazvoku le prefiltrirali v vialo in pustili stati na svetlobi 20 min, so bili v ekstraktu prisotni vsi hipericini. To je razvidno iz slike 21 (črno), kjer vidimo 4 ločene vrhove, ki pripadajo hipericinom. Pri metodi, pri kateri smo vzorec po 20. minutah izpostaviti svetlobi pustili na svetlobi še 48 ur, pa vidimo, da na kromatogramu nista prisotna vrhova, ki pripadata proto- oblikama, vrhova hipericina in psevdohipericina pa sta narasla (slika 21 (rdeče) ter slike od 22 do 25). Ta pojav je pričakovani, saj po izpostavitvi vzorca svetlobi pride do ciklizacije proto- oblik, ki se pretvorita v hipericin oziroma

psevdohipericin (19).

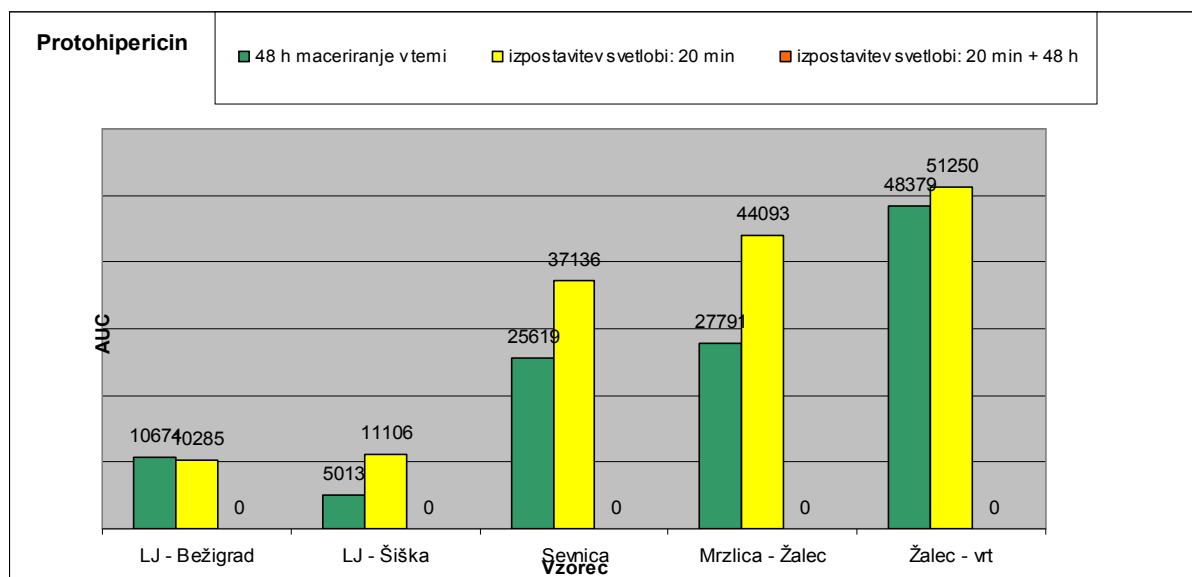
Zanimiv pojav pa smo opazili pri vzorcih, ki so se macerirali 48 h v temi – slika 21 (modro). Sklepali bi, da se bo z daljšim časom maceracije v MeOH izločilo več hipericinov in da bodo njihovi vrhovi višji. A opazimo, da sta v primerjavi z vzorcem, ki je bil izpostavljen svetlobi za 20 min, vrhova za hipericin in psevdohipericin precej nižja, vrhova za protohipericin in protopsevdohipericin pa malo manj. Vzrok za to je verjetno, da so se vzorci macerirali 48 h v temi in tako ni prišlo do pretvorbe proto- oblik v hipericin in psevdohipericin. Da bi našo domnevo preverili, smo viale, ki so vsebovale vzorce iz ekstraktov, ki so se 48 h macerirali v temi, za 4 h postavili na svetlubo. Na sliki 21 (oranžno) lahko vidimo, da je že krajša izpostavitev svetlobi povzročila porast hipericina in psevdohipericina, njuni proto- oblici pa sta izginili. Na podlagi tega rezultata sklepamo, da je naša domneva pravilna



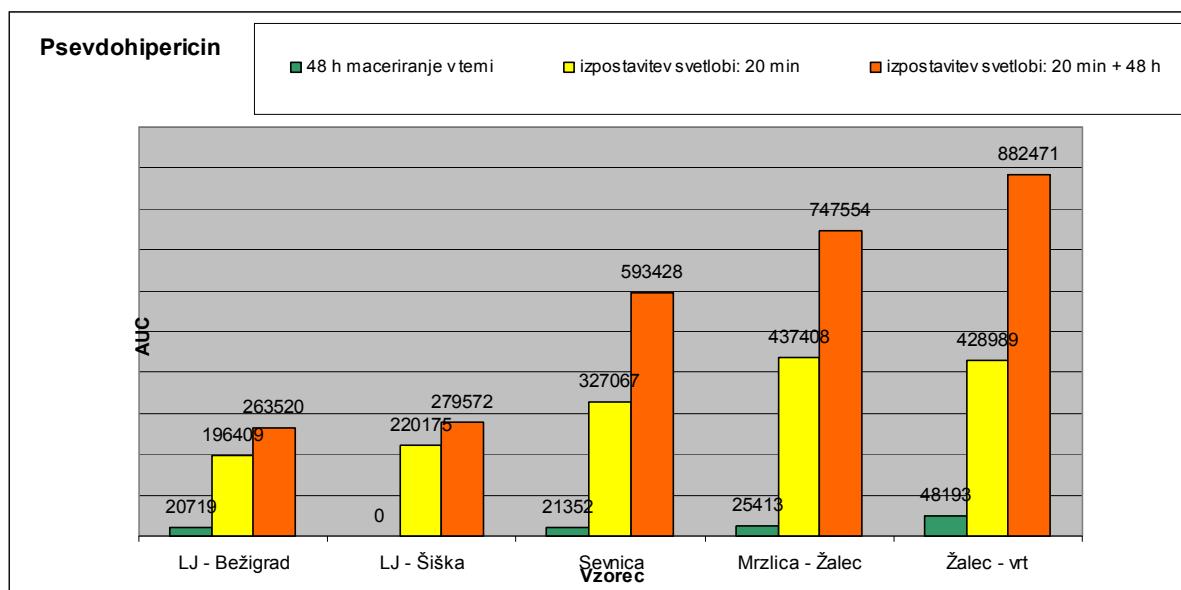
**Slika 21:** Priprava različnih ekstraktov šentjanževke. Črno: svetloba 20 min, rdeče: svetloba 48 h, modro: maceracija 48 h v temi, oranžno: maceracija 48 h v temi, ki ji je sledila izpostavitev svetlobi 4 h.



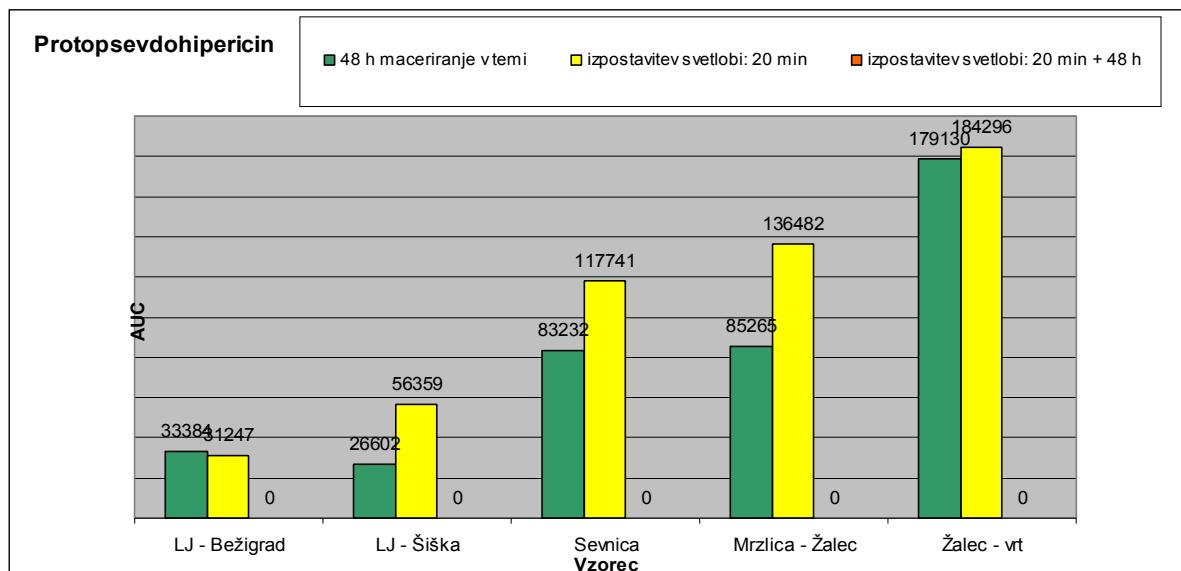
Slika 22: Vsebnost hipericina (AUC) v ekstraktih, pripravljenih po različnih metodah.



Slika 23: Vsebnost protohipericina (AUC) v ekstraktih, pripravljenih po različnih metodah.

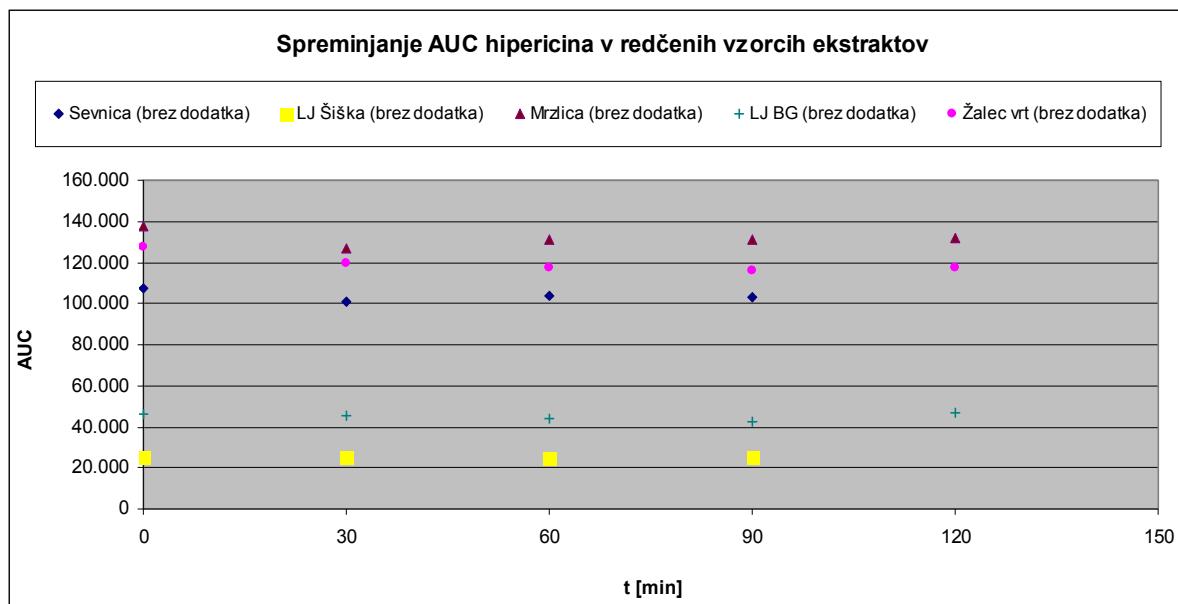


Slika 24: Vsebnost psevdohipericina (AUC) v ekstraktih, pripravljenih po različnih metodah.



Slika 25: Vsebnost protopseudohipericina (AUC) v ekstraktih, pripravljenih po različnih metodah.

AUC vrednosti vzorcev, ki smo jih pripravili v drugem delu točke 4.2.2., prikazuje slika 26. Te meritve smo izvedli, ker smo pri vseh nadaljnjih analizah 100 µl ekstrakta redčili do 200 µl z MeOH, s kislino, bazo ali soljo. Zato smo za kontrolo morali pripraviti razredčene vzorce ekstraktov brez dodatkov, da smo dobili izhodiščne vrednosti AUC, ki so nam služile za primerjavo pri nadaljnjih analizah.

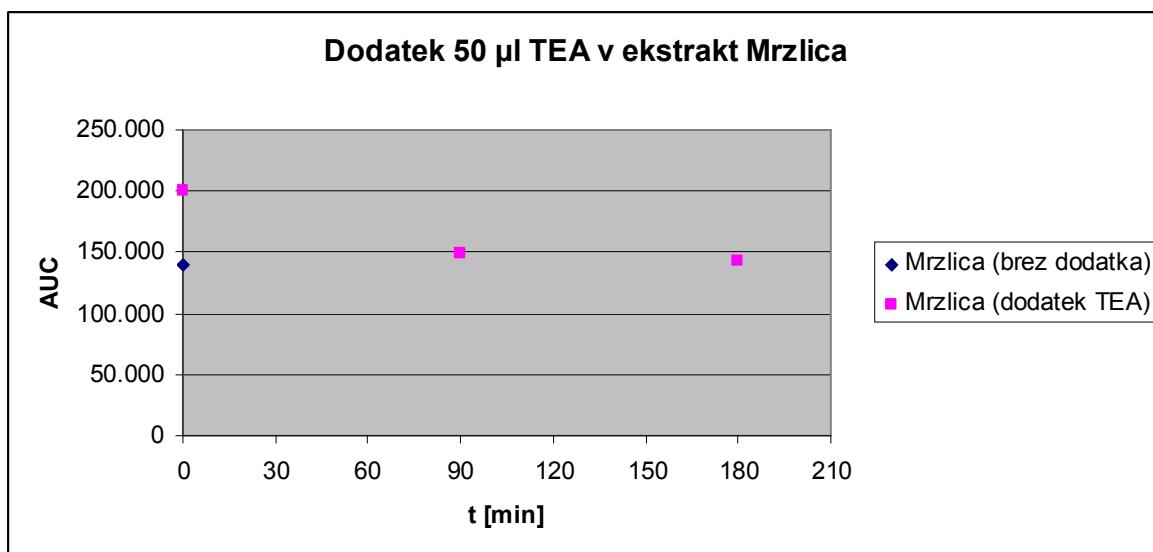


**Slika 26:** Spreminjanje AUC hipericina v redčenih vzorcih, pripravljenih iz ekstraktov, ki so bili 48 h izpostavljeni sončni svetlobi.

#### 5.4.4. Dodatek trietilamina v ekstrakte šentjanževke

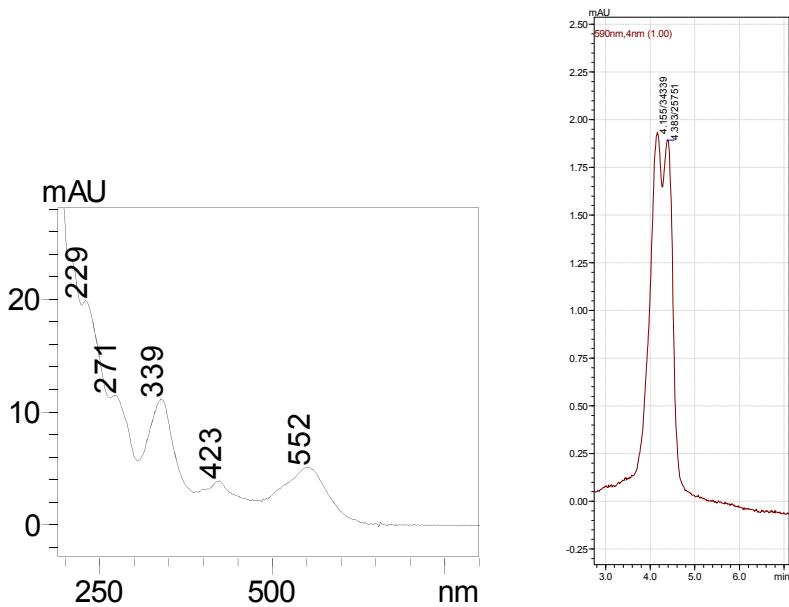
Analizo smo izvedli z vzorci, ki smo jih pripravili v točki 4.2.3. Zaradi lažjega grafičnega prikaza bomo predstavili le rezultate analize vzorca, ki je vseboval ekstrakt šentjanževke, nabранa na Mrzlici, pri vseh ostalih vzorcih pa smo dobili podobne rezultate.

Iz slike 27 lahko vidimo, da AUC hipericina po dodatku baze ob času  $t = 0$  min najprej naraste, nato se po 90 min zniža, a je njegova vrednost še vedno nekoliko višja, kot pa v primeru brez dodatka. Po 180 min pa se AUC zniža na vrednost, ki je blizu vrednosti brez dodatka TEA. Vidimo, da moramo tudi po dodatku baze v vzorce z ekstraktom počakati vsaj 90 min, da dosežemo plato in da so meritve ponovljive. Sklepamo, da je za začetno spremembo AUC odgovoren dodatek TEA, ki povzroči deprotonacijo in porast vrednosti AUC. Ker pa se s časom te vrednosti približajo vrednostim, kot jih ima vzorec brez dodatka baze, bi bilo mogoče, da ostale snovi, ki so prisotne v ekstraktu, delujejo kot počasen pufer, zato dodatek baze na ekstrakt na daljši rok nima vpliva na spremembo vrednosti AUC.



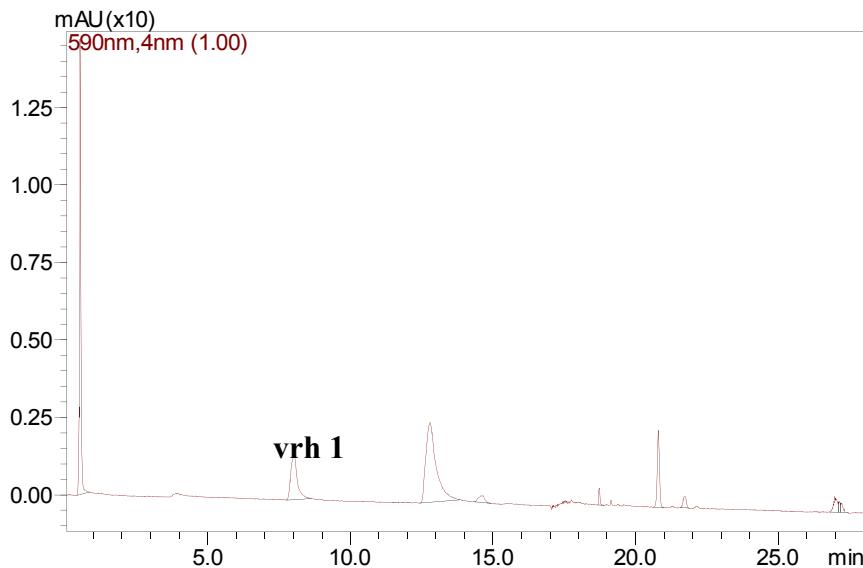
**Slika 27:** Spreminjanje AUC hipericina v ekstraktu Mrzlica po dodatku 50 µl neredčenega TEA

Ob dodatku baze smo opazili, da se vrh, ki pripada psevdohipericinu, spremeni. Vrh se prične po 90 min cepiti na dva vrhova, kar je prikazano na sliki 28 (desno). Zdi se, da je ob dodatku baze prišlo do reakcije z molekulom in do tvorbe nove strukture. Da bi to potrdili, smo preverili absorpcijski spekter spremenjenega vrha, ki je prikazan na sliki 28 (levo). Ugotovili smo, da se ne sklada s spektrom, ki pripada psevdohipericinu (slika 19, desno). Namesto izrazitih vrhov pri 546 in 588 nm imamo v tem primeru vrh pri 552 nm, vrh pri 588 nm pa manjka. Sklepamo, da je prišlo do nastanka nove spojine z drugačnim absorpcijskim spektrom.



**Slika 28:** Levo: absorpcijski spekter nove spojine v UV-VIS. Desno: cepitev vrha, ki pripada psevdohipericinu (absorbanca pri  $\lambda = 590$  nm).

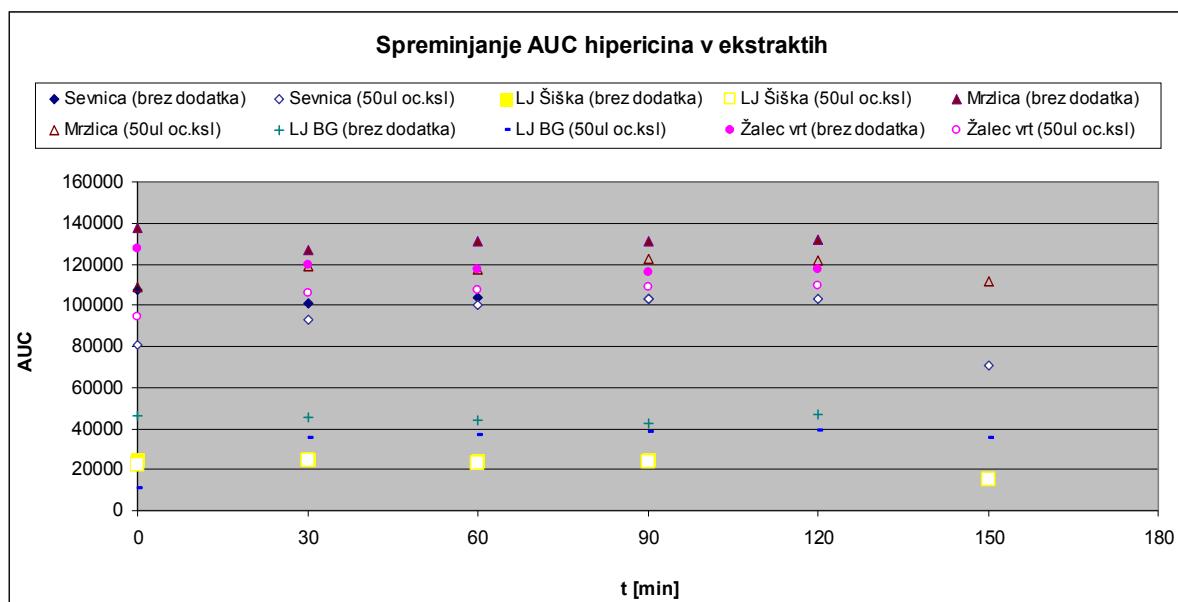
Da bi potrdili našo domnevo, smo takoj po opravljeni analizi v vzorec dodali še 50  $\mu$ l neredčene ocetne kisline. V primeru, da bi bila reakcija TEA z molekulo psevdohipericina reverzibilna, bi po dodatku kisline spet opazili prvoten vrh s  $t_r = 3,6$  min, saj bi dodana kislina nevtralizirala bazo. Na sliki 29 pa lahko vidimo, da se to ni zgodilo. Spremenjeni vrh je po dodatku ocetne kisline sicer res izginil, pojavit pa se je nov vrh s  $t_r = 8,06$  min, na sliki 29 označen kot vrh 1. Ko smo primerjali absorpcijski spekter novega vrha, smo ugotovili, da je enak kot na sliki 28 (levo) in očitno pripada novonastali spojnini. Po dodatku kisline je torej prišlo do spremembe  $t_r$ , ne pa do nevtralizacije in pretvorbe nazaj v psevdohipericin. Sklepamo, da psevdohipericin res reagira z bazo, pri tem nastane nova spojina, ta reakcija pa ni reverzibilna, saj dodatek kisline te spremembe ne odpravi.



**Slika 29:** Kromatogram ekstrakta šentjanževke ob dodatku 50  $\mu\text{l}$  neredčene ocetne kisline (absorbanca pri  $\lambda = 590 \text{ nm}$ ). Pojavi se nov vrh pri času 8,06 min (vrh 1), ki pripada novonastali spojini.

#### 5.4.5. Dodatek ocetne kisline v ekstrakte šentjanževke

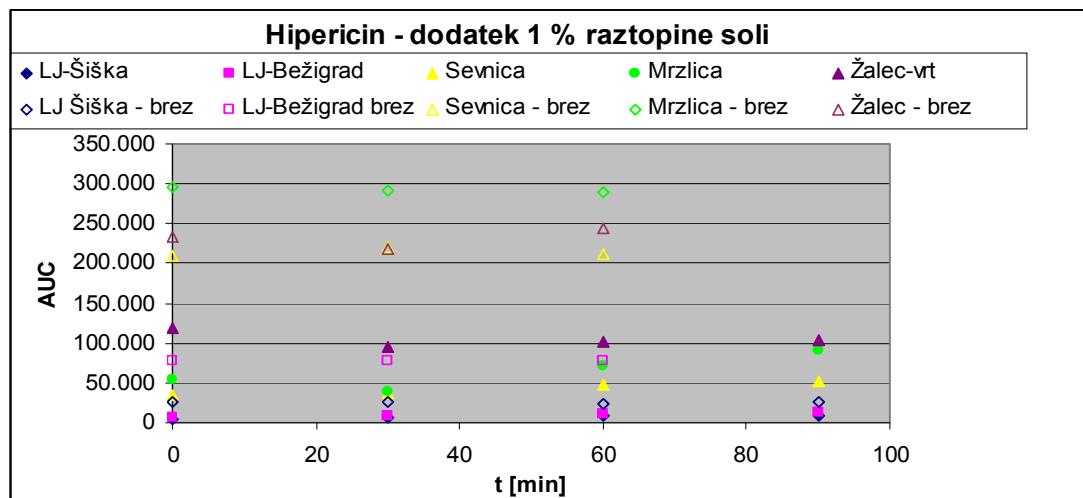
Na sliki 30 vidimo, da dodatek ocetne kisline v ekstrakt vpliva na AUC hipericina. Po dodatku ocetne kisline je potrebno počakati približno 60 min, da se pojavi plato in da lahko izvedemo analizo, nato pa se AUC po daljšem času ponovno prične zniževati (točke na grafu ob času  $t = 150 \text{ min}$  predstavljajo meritve po 24 h). Sklepamo, da je tudi v tem primeru vzrok za spremenjanje AUC v krajšem časovnem intervalu posledica spremembe protonacije molekule, znižanje AUC v daljšem časovnem intervalu pa je verjetno posledica razpada hipericina v kislem. Pri pregledu kromatogramov nismo ugotovili novih vrhov, ki bi pripadali razpadnim produktom, prav tako pa ni prišlo do spremembe absorpcijskih spektrov v UV-VIS območju. Sklepamo, da so nastale razpadne spojine, ki ne fluorescirajo oz. absorbirajo.



**Slika 30:** Spreminjanje AUC hipericina v ekstraktih ob dodatku 50  $\mu$ l ocetne kisline; meritve ob  $t = 150$  min so meritve, opravljene po 24 h.

#### 5.4.6. Dodatek 1 % raztopine mešanice soli NaCl, MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O, Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>) ×H<sub>2</sub>O in CaCO<sub>3</sub> v ekstrakte šentjanževke

V točki 5.3.6. smo ugotovili, da dodatek soli vpliva na AUC standarda hipericina. Zanimalo nas je, ali dodatek iste raztopine mešanice soli vpliva tudi na AUC hipericina v ekstraktih. Rezultate, ki smo jih dobili, prikazuje slika 31.



**Slika 31:** Sprememba AUC hipericina v ekstraktu po dodatu 1 % osnovne raztopine mešanice soli. Ime vzorca, ki vsebuje besedo »brez«, pomeni AUC hipericina v ekstraktu brez dodatka raztopine soli in služi kot primerjava.

Po dodatku raztopine soli se AUC vrednosti hipericina v vseh ekstraktih znižajo. Na sliki 31 prikazane AUC vrednosti hipericina v ekstraktu brez dodatka soli se razlikujejo od AUC vrednosti hipericina v ekstraktu brez dodatka, ki so prikazane na sliki 26. Vzorci ekstrakta, v katere smo dodali raztopino soli, so bili namreč že stari, zato smo posneli nove kromatograme ter vrednosti AUC. Ugotovili smo, da se vrednosti AUC hipericina v ekstraktih razlikujejo (pri drugi meritvi so vrednosti višje), kar kaže na to, da na AUC vrednost hipericina v ekstraktu očitno vpliva tudi starost ekstrakta. Ker so bili vzorci ekstraktov shranjeni v prozornih vialah, bi lahko bil vzrok za zvišanje AUC v sproščanju baz iz stekla in tvorbe hipericin aniona, to pa je vplivalo na dvig AUC.

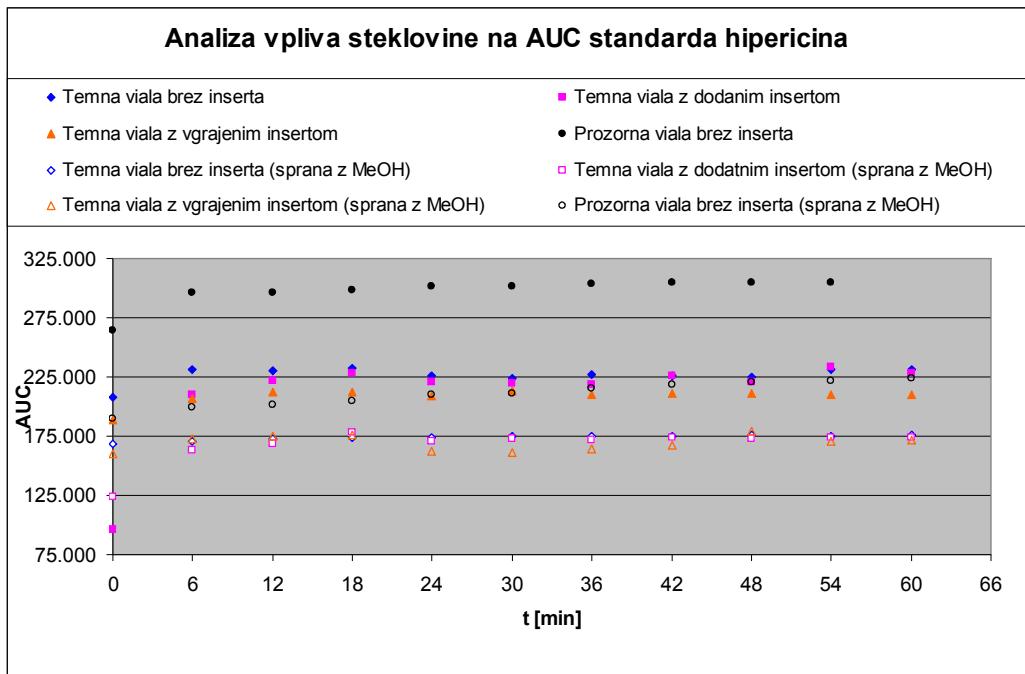
Po dodatku soli smo pri vseh ekstraktih opazili padec AUC vrednosti, ki pripadajo hipericinu. Tudi v tem primeru sklepamo, da so za padec vrednosti AUC odgovorne acidobazične lastnosti raztopine soli ter tvorba kompleksov oz. agregatov med molekulami hipericina in soljo, novonastali agregati pa ne fluorescirajo in absorbirajo. Največji padec AUC vrednosti hipericina smo opazili pri ekstraktih, ki so bili pripravljeni iz droge, ki je bila pripravljena iz manjših rastlin, pri katerih so bili cvetovi slabše kvalitete in je bila zato pripravljena pretežno iz listov (LJ-Šiška ter Bežigrad – padec na 10 – 20 % prvotne vrednosti). Pri ekstraktih, ki so bili pripravljeni iz droge, kjer so bili cvetovi boljše kvalitete in je zato vsebovala predvsem cvetove (Sevnica, Žalec ter Mrzlica), pa smo zabeležili padec na 20 - 45 % prvotne vrednosti. Sklepamo, da je padec odvisen tudi od začetne vsebnosti hipericina v drogi. Pri ekstraktih Sevnica, Žalec ter Mrzlica so bile začetne vsebnosti hipericina višje kot pri ekstraktih LJ-Šiška ter Bežigrad. Ker smo v vse vzorce dodali enako količino soli, je ta količina pri višjih vsebnostih hipericina očitno reagirala le z delom molekul hipericina, zato so AUC vrednosti višje kot pa pri ekstraktih z nižjo vsebnostjo hipericina, ko je dodatek soli reagiral z večjim delom.

## **5.5. Vpliv steklovine na vzorce**

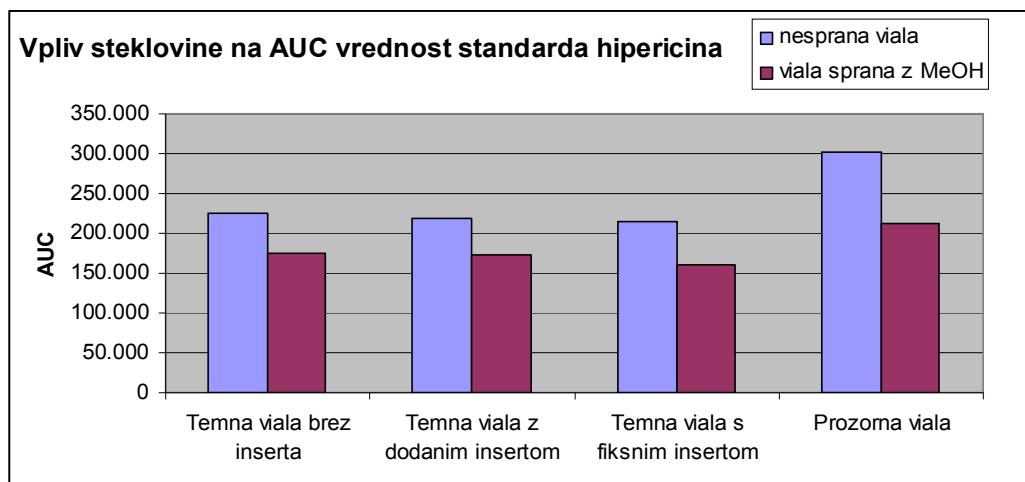
### **5.5.1. Vpliv steklovine na AUC vrednost standarda hipericina**

Na sliki 32 lahko vidimo, da se AUC standarda hipericina spreminja v odvisnosti od materiala, iz katerega je viala izdelana in od tega, ali je bila viala predhodno sprana z MeOH ali ne. Vpliv steklovine ter spiranja je prikazan tudi na sliki 33, kjer smo prikazali AUC

vrednosti v času 30 min, ko je že vzpostavljen plato. Po naši predpostavki na dvig vrednosti AUC standarda hipericina vpliva tudi sproščanje soli in bazičnih snovi iz stekla, ki lahko reagirajo z molekulami hipericina, zato bi lahko bilo pri analizah pomembno tudi to, katere viale uporabljamo in iz katerega tipa stekla so izdelane.



Slika 32: Analiza vpliva steklovine in spiranja na AUC standarda hipericina.



Slika 33: Vpliv steklovine na AUC vrednost standarda hipericina ob času  $t = 30$  min.

### **a) Brez predhodnega spiranja vial z MeOH**

Pri analizah, ki so potekale v različnih vialah, vidimo, da so se vzpostavili različni maksimalni AUC ( $AUC_{max}$ ). Ker so vrednosti AUC, ki smo jih ugotovili pri vzorcu, analiziranem v prozorni viali brez inserta, blizu vrednostim, ki smo jih dobili pri dodatku TEA v vzorce s standardom hipericina, sklepamo, da snovi, ki se sproščajo iz stekla, reagirajo s hipericinom in tvorijo hipericin anion. V primeru, da bi snovi z molekulo hipericina tvorile aggregate, bi opazili znižanje odziva. Ugotovili smo, da so dobljene vrednosti v temnih vialah med sabo podobne in da so podobne vrednostim, ki smo jih ugotovili pri analizi standarda hipericina brez dodatkov (slika 7). Iz slednjega lahko sklepamo, da ta tip vial v raztopino sprošča manj snovi kot pa prozorna viala, pri katerih dobimo najvišje vrednosti AUC.

### **b) Predhodno spiranje vial z MeOH**

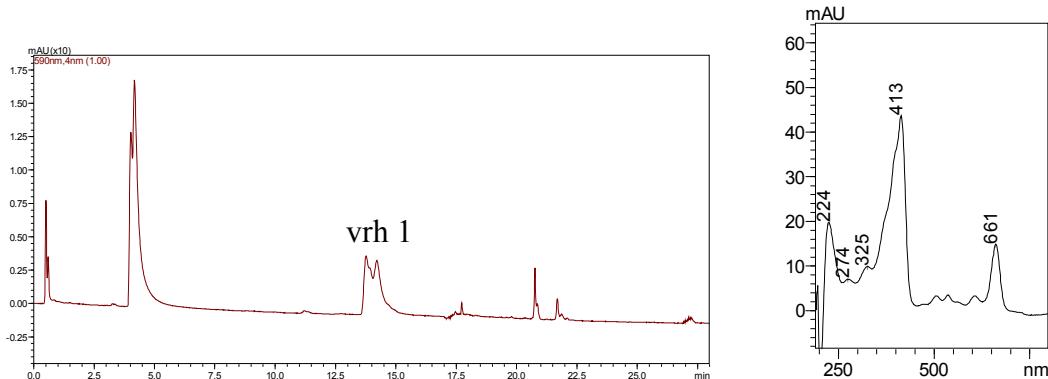
Na slikah 32 in 33 vidimo, da so v vseh primerih vrednosti AUC, ugotovljene pri analizah v spranih vialah, nižje kot pa so vrednosti v nespranih vialah. Kljub spiranju pa so vrednosti v prozorni viali še vedno višje kot pa vrednosti v temnih vialah. Naša domneva je, da se pri spiranju z MeOH snovi iz stekla sprostijo v MeOH, ki ga nato odlijemo, vialo pa posušimo. Ko v takšno vialo injiciramo naš vzorec, je le-ta v stiku s površino stekla, ki je že odpustila snovi, samo sproščanje iz globljih plasti stekla pa je očitno upočasnjeno, zato AUC vrednosti ne narastejo.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da material, iz katerega sta izdelana viala ter njen insert, vpliva na vrednost AUC standarda. Na vrednost AUC vpliva tudi predhodno (ne)spiranje z MeOH. Pri interpretaciji dobljenih rezultatov je zato potrebno upoštevati tudi te dejavnike. Dobljeni rezultati so zagotovo zanimivi, saj so viale, po dobljenih podatkih proizvajalca, izdelane iz stekla tipa 1. Za ta tip stekla velja, da je izdelan iz nevtralnega stekla z visoko hidrolitsko odpornostjo (33). Po tej definiciji steklo torej v raztopino ne bi smelo odpuščati snovi, a kot vidimo v našem primeru, to ne drži. Mogoče je, da se iz stekla vseeno sprošča majhen del snovi, ki že povzroči spremembo vrednosti AUC, mogoče pa je tudi, da so bile viale predhodno kontaminirane, saj niso bile shranjene v sterilnih pogojih, ampak v predalu.

### 5.5.2. Vpliv steklovine na AUC vrednost ekstraktov

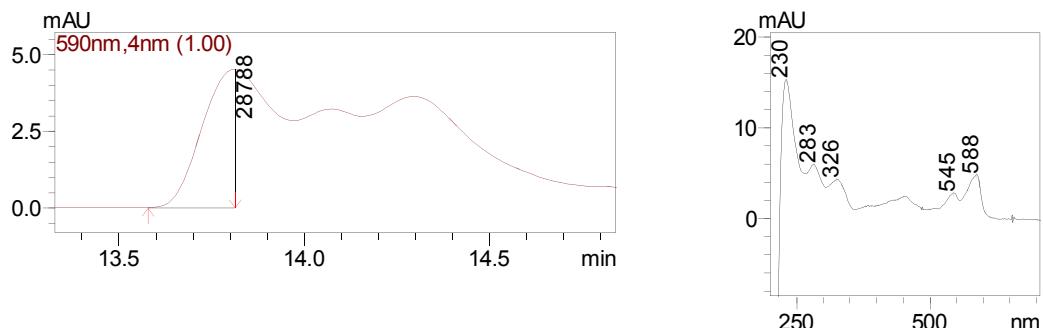
Zanimalo nas je, ali različni tipi vial ter insertov vplivajo na AUC vrednosti ekstraktov. Preden smo pričeli z analizami, smo po metodi v točki 3.2.2.2. pripravili sveže ekstrakte, saj so bili prejšnji že prestari za analizo. Analizirali smo vzorce, ki smo jih pripravili v točki 4.3.2., zaradi lažje preglednosti pa bomo predstavili rezultate, ki smo jih dobili pri analizi ekstrakta »Mrzlica«, analize ostalih vzorcev pa so dale podobne rezultate.

Ko smo na začetku analize posneli kromatogram samega ekstrakta, smo ugotovili, da se vrh, ki pripada hipericinu, prekriva z vrhom za novo spojino (slika 34, levo), ki ima absorpcijski spekter pri 413 in 661 nm (slika 34, desno) in se ne sklada z absorpcijskim spektrom hipericina. Ta spojina fluorescira pri  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/590$  nm ter ima podoben  $t_r$  kot hipericin, zato sklepamo, da je to eden izmed derivatov hipericina, verjetno razpadni produkt, ki bi lahko nastal zaradi staranja droge.



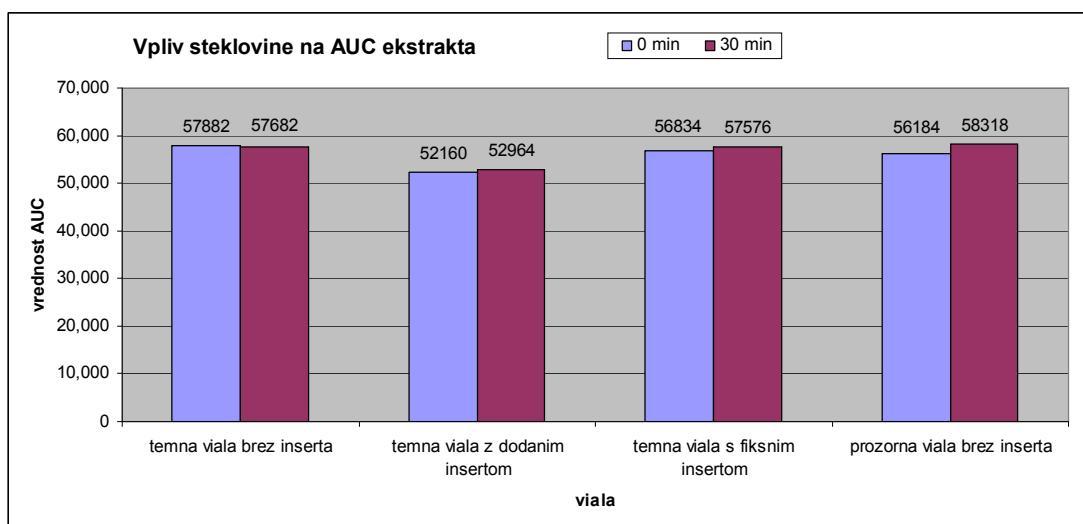
Slika 34: Levo: kromatogram ekstrakta, na katerem je vidno prekrivanje vrha, označenega kot vrh 1, ki pripada hipericinu in vrha novonastale spojine (absorbanca pri  $\lambda = 590$  nm). Desno: absorpcijski spekter nove spojine, posnet v UV-VIS območju.

Ker se je vrh, ki pripada hipericinu, prekrival z drugim vrhom, smo to morali upoštevati pri izračunu AUC. AUC smo izračunali tako, da smo integrirali samo levo površino vrha (slika 35, levo), ki pripada hipericinu, nato pa smo to vrednost pomnožili z dva. Da leva polovica vrha res pripada hipericinu, smo ugotovili s primerjavo absorpcijskega spektra. Primerjali smo absorpcijski spekter v najvišji točki vrha, do katere smo izračunali integral (slika 35, desno) in absorpcijski spekter hipericina. Oba spektra sta se ujemala, zato lahko potrdimo, da leva polovica vrha res pripada hipericinu.



**Slika 35:** Levo: Prikaz izračuna AUC vrednosti hipericina – integracija leve polovice vrha (absorbanca pri  $\lambda = 590$  nm). Desno: absorpcijski spekter v najvišji točki vrha na sliki levo, ki pripada hipericinu, posnet v UV-VIS območju.

Pri analizi ekstraktov v posameznih vialah smo ugotovili, da se s časom nista spreminja na kromatogram ne vrednosti AUC. Tudi pri primerjavi rezultatov, dobljenih pri analizah v različnih vialah, smo ugotovili, da so kromatogrami in vrednosti AUC primerljivi (slika 36). Očitno tip stekla, iz katerega je izdelana viala ali njen insert, le malo vpliva na analizo ekstrakta. Sklepamo, da ostale snovi, ki so bile v drogi in so se ekstrahirale, pufrajo sproščene snovi iz stekla.



**Slika 36:** Primerjava AUC vrednosti v različnih vialah pri ekstraktu »Mrzlica«.

## **5.6. Ustreznost farmakopejske metode**

V Ph. Eur 7.0. je objavljena monografija kvantificiranega suhega ekstrakta šentjanževke, kjer je opisan tudi postopek za določanje celokupne vsebnosti hipericinov v suhem ekstraktu, ki se izvede s pomočjo LC. Na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili pri naših analizah, mislimo, da bi bilo smiselno preučiti, ali navedeni pogoji v monografiji vplivajo na kvantifikacijo ekstrakta, saj se v monografiji za izračun odstotka vsebnosti celokupnih hipericinov, izraženih kot hipericin, uporablja AUC vrednosti. Ker vemo, da se te vrednosti pri različnih pogojih spreminja, sklepamo, da je smiselno preučiti še pogoje v monografiji. Čeprav smo ugotovili, da so bili naši ekstrakti manj občutljivi na spremembe, ki so nastale v krajšem časovnem obdobju, pa bi bilo podobne analize smiselno izvesti še z referenčno raztopino, ki vsebuje *suhi ekstrakt šentjanževke HRS*. Mogoče je, da ima ta standard nižjo vsebnost snovi, ki pufrajo in blažijo spremembe, zato bi že manjši vplivi, kot na primer sproščanje snovi iz stekla ali različna kislota MF lahko pri analizah povzročili nenamerne napake, ki bi se kazale kot sprememba vrednosti AUC, kar pa bi privedlo do napačnega izračuna vsebnosti.

## 6. SKLEP

V prvem delu diplomske naloge smo poiskali optimalno metodo za pripravo ekstraktov. Ugotovili smo, da imajo vzorci, ki so bili izpostavljeni svetlobi, najvišjo vsebnost hipericina ter psevdohipericina, saj pride do pretvorbe proto- oblik v hipericin oz. psevdohipericin. Ta metoda priprave ekstraktov je tudi najprimernejša, saj z začetno popolno pretvorbo proto- oblik poskrbimo, da v nadaljevanju analiz ne pride do zviševanja AUC vrednosti hipericina, ki bi bilo posledica ciklizacije na svetlobi in posledično do napačne interpretacije rezultatov. S primerjanjem literarnih podatkov smo tudi ugotovili retencjske čase samega hipericina ter hipericinov v ekstraktih in ugotovili, da se pri ločbi ekstraktov na koloni proto- obliki vedno eluirata pred psevdohipericinom ter hipericinom.

V drugem delu diplomske naloge smo ugotavljali vpliv matriksa, ki ga je predstavljal dodatek ocetne kisline, trietilamina, mešanice in posameznih soli  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  in  $\text{CaCO}_3$ , na vzorce. Pri opazovanju vplivov matriksa na standard hipericina smo ugotovili, da na vrednosti AUC vplivata dodatek kisline in baze. V obeh primerih je sprememba vrednosti AUC verjetno posledica (de)protonacije molekule, ki spremeni resonančno stabilizacijo. Naša teorija, ki nam je ni uspelo potrditi, je, da pride do spremembe valovne dolžine, pri kateri molekula absorbira oz. fluorescira, mi pa pri detekciji pri  $\lambda = 590$  nm opazimo spremenjeni odziv. Pri dodatku kisline smo tudi ugotovili, da pride s časom do razpada molekule, vendar nam ni uspelo ugotoviti razpadnih produktov. Pozorni pa moramo biti tudi na spiranje kolone, saj lahko ostanek kisline ali baze na koloni spremeni vrednosti AUC. Na spremembo vrednosti AUC v vzorcu standarda pa vplivata tudi koncentracija ter vrsta soli. Sklepamo, da pride v tem primeru do vpliva acidobazičnih lastnosti raztopin soli na hipericin in do tvorbe agregatov oz. kompleksov z molekulami hipericina, jakost znižanja odziva pa je odvisna od posameznih soli, saj nekatere soli močneje znižajo odziv kot druge.

Spreminjanje vrednosti AUC smo opazili tudi pri dodatku kisline ali baze v vzorce ekstraktov. Sklepamo, da je tudi v tem primeru vzrok za spremembe (de)protonacija molekule. Pri dodatku soli v vzorce ekstraktov pa smo ugotovili, da je znižanje odziva odvisno od vrste soli ter od vsebnosti hipericina v ekstraktu. Ker smo v vse vzorce dodali enake količine soli, je

dodana količina pri ekstraktih z višjo vsebnostjo hipericina reagirala le z delom molekul hipericina, zato so AUC vrednosti višje kot pa pri ekstraktih z nižjo vsebnostjo hipericina, ko je dodatek soli reagiral z večjim delom molekul. Tudi tukaj sklepamo, da so za padec vrednosti AUC odgovorne acidobazične lastnosti soli ter tvorba kompleksov oz. agregatov med molekulami hipericina in soljo, novonastale tvorbe pa ne fluorescirajo in absorbirajo. Pri analizi vpliva steklovine na vzorce smo ugotovili, da pri vzorcih standarda material, iz katerega sta izdelana viala ter njen insert, vpliva na vrednosti AUC. Na vrednosti AUC vpliva tudi predhodno (ne)spiranje z MeOH. Tip stekla, iz katerega sta izdelana viala ali njen insert, pa po dobljenih rezultatih očitno ne vpliva na analizo ekstrakta, saj se v tem primeru AUC vrednosti niso spreminjale. Sklepamo, da ostale snovi, ki so bile v drogi in so se ekstrahirale, pufrajo sproščanje snovi iz stekla, zato sprememb ne opazimo.

V nadaljevanju bi bilo smiselno izvesti še analize z referenčno raztopino, ki vsebuje *suhi ekstrakt šentjanževke HRS* in preveriti ustreznost farmakopejskega postopka. Mogoče je, da ima ta standard nižjo vsebnost snovi, ki pufrajo in blažijo spremembe, zato bi že manjši vplivi lahko pri analizah povzročili nenamerne napake, ki bi se kazale kot sprememba vrednosti AUC, kar pa bi privedlo do napačnega izračuna vsebnosti. Smiselno bi bilo izvesti še analize z vzorci standarda in ekstraktov, ki bi jim bila dodana raztopina pufra. S temi analizami bi potrdili naše domneve, da so spremembe vrednosti AUC posledica spremembe pH v vzorcu in da določene snovi v ekstraktih verjetno delujejo kot pufri in blažijo spremembe, ki so posledica matriksa. S tem bi lahko tudi preverili, ali pri dodatku raztopin soli prevladajo acidobazične lastnosti soli ali pa je za spremembo AUC odgovorna tvorba agregatov.

## **7. LITERATURA**

1. Tawaha K, Gharaibeh M, El-Elimat T, Alali FQ: Determination of hypericin and hyperforin content in selected Jordanian Hypericum species. *Industrial Crops and Products* 2010; 32: 241-245.
2. Cao X, Wang Q, Li Y, Bai G, Ren H, Xu C, Ito Y: Isolation and purification of series bioactive components from *Hypericum perforatum* L. by counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B* 2011; 879: 480-488.
3. Pages G, Delaurent C, Phan-Tan-Luu R, Sergent M: Different chemometric approaches to optimize the assay of St. John's Wort active ingredients. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2007; 86: 159-167.
4. Galle-Toplak K: Zdravilne rastline na Slovenskem, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2002: 132-133.
5. Šentjanževka – zunanja uporaba: [http://www.gorenjske-lekarne.si/si/zdravilne-rastline\\_3/sentjanzevka-zunanja-uporaba](http://www.gorenjske-lekarne.si/si/zdravilne-rastline_3/sentjanzevka-zunanja-uporaba) (Dostop: marec 2013).
6. Šentjanževka (*Hypericum perforatum*): <http://www.zdravilnerastline.si/rastline-s-z/28-sentjanzevka-hypericum-perforatum.html> (Dostop: marec 2013).
7. Pravilnik o razvrstitvi zdravilnih rastlin, 2008, Uradni list RS št. 103/2008 z dne 30.10.2008, stran 13637.
8. Li W, Fitzloff JF: High performance liquid chromatographic analysis of St. John's Wort with photodiode array detection. *Journal of Chromatography B* 2001; 765: 99-105.
9. Jensen AG, Cornett C, Gudiksen L, Hansen SH: Characterisation of extracts of *Hypericum perforatum* L. using an on-line HPLC system with UV/visible and fluorescence detection prior to and after photochemical conversion of the effluent. *Phytochemical Analysis* 2000; 11: 387–394.
10. Gemal Jensen A, Honore Hansen S: Separation of hypericins and hyperforins in extracts of *Hypericum perforatum* L. using non-aqueous capillary electrophoresis with reversed electro-osmotic flow. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002; 27: 167–176
11. Šentjanževka (*Hypericum perforatum*): <http://www.pomurske-lekarne.si/si/index.cfm?id=1562> (Dostop: marec 2013).
12. St John's Wort Benefits and Side Effects: <http://www.healthguidance.org/entry/3451/1/St-Johns-Wort-Benefits-and-Side-Effects.html> (Dostop: marec 2013).
13. Ann L, Vandenbogaerde AL, Kamuhabwaa A, Delaeya E, Himpensb BE, Merlevedec

WJ, de Witte PA: Photocytotoxic effect of pseudohypericin versus hypericin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1998; 45: 87-94.

14. Martinez-Poveda B, Quesada A, Medina MA: Hypericin in the dark inhibits key steps of angiogenesis in vitro. *European Journal of Pharmacology* 2005; 516: 97-103.
15. Brutovska R., Čellarova E, Doležel J: Cytogenic variability of in vitro regenerated *Hypericum perforatum* L. plants and their seed progenies. *Plant Science* 1998; 133: 221-229.
16. Southwell IA, Bourke CA: Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). *Phytochemistry* 2001; 56: 437-441.
17. Zobayed SMA, Afreen F, Goto E, Kozai T: Plant–Environment Interactions: Accumulation of Hypericin in Dark Glands of *Hypericum perforatum*. *Annals of Botany* 2006; 98: 793-804.
18. Schmidt AH: Use of an on-line, precolumn photochemical reactor in high-performance liquid chromatography of naphtodiantrones in *Hypericum perforatum* preparations. *Journal of Chromatography* 2003; 987: 181-187.
19. Liu F, Pan C, Drumm P, Ang CYW: Liquid chromatography-mass spectrometry studies of St. John's Wort methanol extraction: active constituents and their transformation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005; 37: 303-312.
20. Fourneron JD, Herbette G, Caloprisco E: Pseudohypericin and hypericin in St. John's Wort extracts. Breakdown of pseudohypericin. *Bioorganic and medicinal chemistry* 1999; 2: 127-131.
21. Skalkos D, Tatsis E, Gerothanassis IP, Troganis A: Towards a consensus structure of hypericin in solution: direct evidence for a single tautomer and different ionization states in protic and nonprotic solvents by the use of variable temperature gradient  $^1\text{H}$  NMR. *Tetrahedron* 2002; 58: 4925-4929.
22. Arabeı SM, Pavich TA, Galaup JP, Jardon P: Influence of the nature of sol-gel matrices on absorption and fine-structure fluorescence spectra of hypericin. *Chemical Physics Letters* 1999; 306: 303-313.
23. Bauer S, Störmer E, Graubaum HJ, Roots I: Determination of hyperforin, hypericin and pseudohypericin in human plasma using high-performance liquid chromatography analysis with fluorescence and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B* 2001; 765: 29-35.
24. Anyzewska M, Kowalcuk A, Lozak A, Jabłczynska R, Fijalek Z: Determination of total hypericins in St. John's Wort and herbal medicinal products. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* 2010; 67: 587-593.
25. Gioti ME, Skalkos DC, Fiamegos YC, Stalikas CD: Single-drop liquid-phase microextraction for the determination of hypericin, pseudohypericin and hyperforin in

biological fluids by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2005; 1093: 1-10.

26. Pages G, Delaurent C, Phan-Tan-Luu R, Sergent M: Different chemometric approaches to optimize the assay of St. John's Wort active ingredients. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2007; 86: 159-167.
27. Gadzovksa S, Maury S, Ounnar S, Righezza M, Kascakova S, Refregiers M, Spasenoski M, Joseph C, Hagege D: Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L. in vitro cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 2005; 43: 591-601.
28. Pirker R, Huck CW, Bonn GK: Simultaneous determination of hypericin and hyperforin in human plasma and serum using liquid-liquid extraction, high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2002; 777: 147-153.
29. De los Reyes GC, Koda RT: 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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001; 26: 959-965.
30. Huygens A, Kumuhabwa AR, de Witte PAM: Stability of different formulations and ion pairs of hypericin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2005; 59: 461-468.
31. Huntosova V, Alvareza L, Bryndzova L, Nadovab Z, Jancurab D, Buriankova L, Bonneaua S, Braulta D, Miskovsky P, Sureaua F: Interaction dynamics of hypericin with low-density lipoproteins and U87-MG cells. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 389: 32-40.
32. Evropska farmakopeja 7.0. 2011. St. John's Wort dry extract, quantified (*Hyperici herbae extractum siccum quantificatum*). European Pharmacopoeia 7.0. Strasbourg, Council of Europe: str. 4878.
33. Evropska farmakopeja 5.0. 2005. Glass containers for pharmaceutical use. European Pharmacopoeia 5.0. Strasbourg, Council of Europe: str. 303.
34. Wang D, Bai J, Sun F, Yang D: Chemical constituents and antidepressant activity of the new species *Hypericum enshense* occurring in China. *Phytomedicine* 2010; 17: 410-413.