

# Određivanje sadržaja ukupnih hipericina u odabranim vrstama roda *Hypericum* L.

KROATA HAZLER PILEPIĆ<sup>1</sup>, ANITA ČORIĆ<sup>2</sup>, MARINA RADOVČIĆ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,  
Zavod za farmaceutsku botaniku, Schrottova 39, 10 000 Zagreb

<sup>2</sup>Ljekarna Splitsko-dalmatinske županije,  
Laboratorij za provjeru kakvoće galenskih pripravaka i identifikaciju ljekovitih tvari,  
Mihanovićeve 35, 21000 Split

## Determination of total hypericins in selected *Hypericum* L. species

*A b s t r a c t* – *Hypericum* L. (Hypericaceae), a large genus widespread in the temperate regions of Earth, contains approximately 450 species easily recognizable by their golden flowers. The naphthodianthrone pigment hypericin, a photoactive polycyclic anthrone is one of the most important bioactive compound present in the plants of this genus. In this work the quantity of total hypericins, expressed as hypericin, was determined by the spectrophotometric method in flowering upper parts of the six species from the genus *Hypericum*: *H. delphicum* Boiss & Heldr, *H. hircinum* L., *H. kouytchense* H. Lév., *H. oblongifolium* Choisy, *H. perforatum* L. and *H. richeri* Vill. subsp. *grisebachii* (Bois.) Nyman. Extracts were obtained using two extraction solvents: a mixture of tetrahydrofuran/water and methanol. The highest content of total hypericins was determined in the samples of *H. richeri* Vill. subsp. *grisebachii*, while the smallest in the samples of *H. hircinum*, *H. kouytchense* and *H. oblongifolium*.

(<sup>1</sup>University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Botany, Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia, and <sup>2</sup>Pharmacy of Split-Dalmatia County, Laboratory for quality control of galenic preparations and identification of medicinal substances, Mihanovićeve 35, 21000 Split, Croatia)

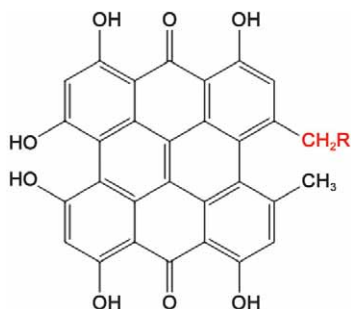
## UVOD

Vrsta *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae), gospina trava ili rupičasta pljuškavica, jedna je od najstarijih ljekovitih biljaka. Poznavali su je stari liječnici Dioskurid, Plinije i Hipokrat te je primjenjivali za liječnje različitih bolesti (1). Također, etnobotanička istraživanja svih europskih naroda bilježe upotrebu njezinih vršnih cvatućih dijelova, najčešće za zacijeljivanje opekline i rana, dispepsije, upala mokraćnog i dišnog trakta (2, 3). Toj ljekovitoj biljnoj vrsti službena medicina pridaje važnost tek nakon provedenih farmakoloških istraživanja i kliničkih studija kojima je potvrđena antidepresivna aktivnost te efikasnost u liječenju blagih i umjerenih depresija, premda nije utvrđen jedinstven mehanizam djelovanja. Također, pripravci gospine trave mogu se koristiti i za liječenje određenih oblika anksioznosti. No, pri primjeni ove ljekovite biljne vrste potreban je oprez zbog interakcija s mnogim lijekovima (4). Novija znanstvena istraživanja upućuju na njezin veliki potencijal u fotodinamičkoj terapiji tumora (5–7). Rodu *Hypericum* pripada više od 450 vrsta koje su sve, poput ljekovite gospine trave, prepoznatljive po zlatno žutim cvjetovima (tablica 1.). Ovaj rod vrlo bogat vrstama podijeljen je u 30 sekcija i 6 podsekcija (8).

Hipericin (slika 1.) je crveni pigment, derivat naftodiantrona koji se prema IUPAC-ovoj nomenklaturi naziva *1, 3, 4, 6, 8, 13-heksahidroksi-10, 11-dimetil fenantro[1, 10, 9, 8- opkra] prilen-7, 14-dion*. Hipericin i srodni antronski derivati poput pseudohipericina (slika 1.) su metaboliti specifični samo za rod *Hypericum* i nisu zapaženi drugdje u biljnom svijetu. Niz provedenih istraživanja dokazuju raznolikost u sadržaju hipericina i srodnih derivata unutar roda (9, 10). Prisutnost hipericina je važna za kemotaksonomiju, jer su ti naftodiantroni specifični jedino za vrste koje pripadaju filogenetski naprednijim sekcijama roda poput *Hypericum*, *Drosocarpium*, *Thasia*, *Adenosepalum*, što upućuje na razvoj ovog metaboličkog puta kao evolucijskog faktora prilagodbe. Hipericinima bogate vrste poput *H. boissieri*, *H. barbatum* i *H. rumeliacum* mogu sadržavati dva do četiri puta veću količinu hipericina od vrste *H. perforatum*. Dosad je istražena približno polovina vrsta roda *Hypericum*, a vrsta *H. perforatum* još je uvijek jedini izvor droge Hyperici herba jer hipericin i njegovi derivati nisu jedini aktivni sastojci, već antidepresivna aktivnost ekstrakta ovisi i o prisutnosti hiperforina i flavonskih spojeva (4, 11). Prednosti gospine trave su rasprostranjenost širom svijeta, sposobnost prilagodbe na različite okolišne uvjete kao i ekonomičnost uzgoja (8).

U ovom istraživanju određen je sadržaj ukupnih hipericina izraženih kao hipericin u osušenim nadzemnim cvatućim ograncima pet vrsta roda *Hypericum*: *H. delphicum* Boiss & Heldr, *H. hircinum* L., *H. kouytchense* H. Lév, *H. oblongifolium* Choisy i *H. richeri* Vill. subsp. *grisebachii* (Bois.) Nyman., te su dobivene vrijednosti uspoređene s vrijednostima količine ukupnih hipericina u uzorku ljekovite vrste *H. perforatum* L. Istraživanje je provedeno koristeći spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih hipericina prema farmakopejskom propisu (12) čime je obuhvaćen sadržaj hipericina i pseudohipericina, zatim njihovih prekursora protohipericina i protopseudohipericina, te derivata ciklopseudohipericina. Ekstrakcija djelatnih komponenata

droga je provedena na dva načina: sa smjesom vode i tetrahidrofurana te s metanolom. S obzirom na topljivost hipericina i ostalih naftodiantrona u polarnim organskim otapalima kao što je metanol, cilj je bio utvrditi količinu djelatnih komponenti dobivenu tim otapalom te usporediti s količinom dobivenom prema farmakopejskom propisu.



Slika 1. Hipericin, R = H, pseudohipericin, R = OH

## EKSPERIMENTALNI DIO

### Biljni materijal

Cvatući nadzemni dijelovi šest vrsta roda *Hypericum* (tablica 1.) sabrani su u kasno proljeće/ljeto 2009. godine. S prirodnih staništa sabrane su naše autohtone vrste: *H. perforatum* (Risnjak) i *H. richeri* subsp. *grisebachii* (Velebit), dok su uzorci vrsta koje ne rastu na području Hrvatske skupljeni s uzgojenih jedinki u Farmaceutskom botaničkom vrtu »F. Kušan«. Identifikacija biljnog materijala provedena je temeljem morfološke analize (13–15).

### Priprema biljnih ekstrakata







Na jedanak su način pripremljeni ekstrakti koristeći dva različita otapala: smjesu vode i tetrahidrofurana (20:80, V/V) (12) i metanol. Biljni materijal ekstrahiran je prema farmakopejskom postupku (12) uz izvjesne modifikacije:

0,8 g praškasto usitnjenog biljnog materijala ekstrahirano je sa 60 mL otapala 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo pri temperaturi od 70 °C. Dobiveni ekstrakt filtriran je kroz sloj vate, a postupak ekstrakcije ponovljen je s ostacima biljnog materijala i vatom koristeći novih 60 mL otapala. Dobiveni filtrati su sjedinjeni i upareni do suha.

### Određivanje sadržaja ukupnih hipericina

Suhi ostatak je rastopljen u 15 mL metanola i kvantitativno prebačen u odmjernu tikvicu od 25,0 mL koje je dopunjena metanolom do oznake. Otopina je profiltrirana, a 5,0 mL filtrata je razrijeđeno do 25,0 mL metanolom. Apsorbancija je izmjerena na 590 nm uz metanol kao poredbeno otopinu (6) koristeći UV-VIS spektrofotometar Lambda 25 (Perkin Elmer, SAD).

**Tablica 1.** Istraživane vrste roda *Hypericum* (naziv biljne vrste, geografska rasprostranjenost te naziv i broj sekcije)

<i>H. delphicum</i> Boiss & Heldr Grčka <i>Adenosepalum</i> (27)	<i>H. hircinum</i> L. Središnja/Istočna Europa, Levant <i>Androsaemum</i> (5)	<i>H. kouytchense</i> H.Lév. Kina <i>Ascyreia</i> (3)
		
<i>H. oblongifolium</i> Choisy Indija <i>Ascyreia</i> (3)	<i>Hypericum perforatum</i> L. Svi kontinenti <i>Hypericum</i> (9)	<i>H. richeri</i> Vill subsp. <i>grisebachii</i> (Boiss.) Nyman Središnja/Istočna Europa <i>Drosocarpium</i> (13)
		

Postotni sadržaj ukupnih hipericina, izraženih kao hipericin, izračunat je prema izrazu:

$$\% = A \times 125 / m \times 870$$

A = apsorbancija na 590 nm

m = odvaga biljnog materijala (g)

870 = specifična apsorbancija hipericina

Određivanja sadržaja ukupnih hipericina rađena su u triplicatu, a dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Za provjeru signifikantnosti razlika između količina ukupnih hipericina dobivenih ekstrakcijom različitim otapalima korišten je t test za nezavisne uzorke, uz vrijednost  $p < 0,05$  kao statistički značajnu razliku.

## REZULTATI I RASPRAVA

Hipericin i pseudohipericin su prvi put izolirani iz vrste *H. perforatum* (16, 17). U toj je vrsti sadržaj naftodiantrona u rasponu od 0,05 do 0,3 % (18) i varira ovisno o geografskom podrijetlu, nadmorskoj visini, uvjetima osvjetljenja, dobu godine (19). Sadržaj pseudohipericina (0,03–0,34 %) je dva do četiri puta veći od sadržaja hipericina (0,03–0,09 %) (20), a biljni materijal također sadrži protohipericin, protopseudohipericin i ciklopseudohipericin. Protohipericin i protopseudohipericin su biosintetski prekursori hipericina i pseudohipericina koji u njih prelaze u prisutnosti sunčevog svjetla (21). Pseudohipericin se najvjerojatnije transformira u ciklopseudohipericin (22).

Hipericin je netopljiv u vodi, ulju, metilen kloridu i drugim nepolarnim otapalima. Topljiv je u alkalnim vodenim otopinama, organskim bazama kao što je piridin i polarnim organskim otopinama kao što su aceton, etanol, metanol, etil acetat, etil metil keton i druge (23). U biljnom materijalu hipericin se nalazi kao kalijeva ili natrijeva sol (24), što i objašnjava njegovu topljivost u organskim otapalima. Unutar stanice inkorporiran je u fosfolipidni dvosloj i prema tome lociran u endoplazmatском retikulumu i Golgijevom aparatu zbog svog lipofilnog karaktera (25, 26).

Gubitak sušenjem biljnog materijala korištenog u istraživanju je u rasponu od 6,18 do 8,66 % što odgovara farmakopejskim zahtjevima (maksimalno 10 %). U uzorku vrste *H. perforatum* koji je analiziran u ovom istraživanju sadržaj ukupnih hipericina iznosi  $0,21 \pm 0,0004$  % i  $0,22 \pm 0,0048$  %, ovisno o otapalu pri ekstrakciji (tablica 2.), a dobivena vrijednost u skladu je s dostupnim podacima provedenih istraživanja različitih populacija ove vrste na području Europe (27, 28). Podjednak sadržaj ukupnih hipericina poput onog određenog u uzorku oficinalne vrste određen je u uzorku vrste *H. delphicum* ( $0,22 \pm 0,0098$  % i  $0,24 \pm 0,0035$  %) što je u skladu s dostupnim podacima (10). Najveći sadržaj ukupnih hipericina određen je u uzorku vrste *H. richeri* subsp. *grisebachii* i iznosi 4–5 puta više od sadržaja ukupnih hipericina u uzorku oficinalne droge *Hyperici herba* ( $0,79 \pm 0,0070$  % i  $1,07 \pm 0,0052$  %). Kao što je i očekivano, jedva mjerljive količine ukupnih hipericina sadrže uzorci vrsta koje prema intrageneričkoj klasifikaciji pripadaju primitivnijim sekcijama (9, 10), a to su *H. kouytchense* i *H. oblongifolium* iz sekcije 3. *Ascyreia*, te vrsta *H. hircinum* koja pripada sekciji 5. *Androsaemum*. Vrste koje pripadaju naprednijim sekcijama kao što su *H. richeri* subsp. *grisebachii*, koja pripada sekciji 13. *Drosocarpium* i *H. delphicum*, koja pripada sekciji 27. *Adenosepalum*, sadrže veliki postotak ukupnih hipericina. S obzirom na usporedbu tetrahidrofurana i metanola kao ekstrakcijskih sredstava, u uzorcima s visokim sadržajem ukupnih hipericina ekstrakcija metanolom pokazala se uspješnijom te je utvrđena statistički značajna razlika između korištenih otapala ( $p < 0,05$ ).

Prema zahtjevima Europske farmakopeje u drogi zelen gospine trave (*Hyperici herba*) sadržaj ukupnih hipericina je minimalno 0,08 % izražen kao hipericin i izračunat

u odnosu na suhu drogu (12). Taj zahtjev, osim uzorka oficinalne vrste, zadovoljavaju i uzorci vrsta *H. delphicum* i *H. richeri* subsp. *grisebachii*. Ipak, da bi se potvrdila sličnost s oficinalnom drogom u sastavu ostalih aktivnih komponenti, potrebno je provesti kvalitativnu i kvantitativnu analizu ekstrakata ovih dviju vrsta, osobito što se tiče sastava i sadržaja flavonoida i hiperforina. Dosad provedenim istraživanjem ovih dviju vrsta, utvrđena je dvostruko manja količina ukupnih flavonoida i tri do četiri puta manja količina ukupnih fenolskih kiselina u poredbi s uzorkom oficinalne vrste *H. perforatum* (29).

Tablica 2. Sadržaj ukupnih hipericina u ekstraktima šest vrsta roda *Hypericum*.

UZORAK	EKSTRAKT 1 <sup>1)</sup>	EKSTRAKT 2 <sup>2)</sup>
	sadržaj ukupnih hipericina/suha droga, % <sup>3)</sup>	
<i>Hypericum delphicum</i>	0,22 ± 0,0098*	0,24 ± 0,0035*
<i>H. hircinum</i>	0,01 ± 0,0001	0,01 ± 0,0011
<i>H. kouytchense</i>	0,01 ± 0,0002	0,01 ± 0,0003
<i>H. oblongifolium</i>	0,01 ± 0,0006	0,01 ± 0,0002
<i>H. perforatum</i>	0,21 ± 0,0004	0,22 ± 0,0048
<i>H. richeri</i> subsp. <i>grisebachii</i>	0,79 ± 0,0070*	1,07 ± 0,0052*

<sup>1)</sup>: tetrahidrofuran:voda (20:80, V:V); <sup>2)</sup>: metanol; <sup>3)</sup>:  $\bar{x} \pm SD$  (n = 3); \*p<0,05

## ZAKLJUČAK

U ovom je istraživanju određen sadržaj ukupnih hipericina u šest vrsta roda *Hypericum* različite geografske rasprostranjenosti i unutargeneričke pripadnosti. Uzorci vrsta *H. perforatum* i *H. delphicum* sadrže podjednaku količinu ukupnih hipericina, dok sadržaj ukupnih hipericina u uzorku vrste *H. richeri* subsp. *grisebachii* 4–5 puta premašuje sadržaj ukupnih hipericina u uzorku oficinalne droge *Hyperici herba*. Jedva mjerljive količine ukupnih hipericina sadrže uzorci vrsta *H. hircinum*, *H. kouytchense* i *H. oblongifolium*. Iako uzorci vrsta *H. delphicum* i *H. richeri* subsp. *grisebachii* zadovoljavaju zahtjevu Europske farmakopeje prema kojem minimalni sadržaj ukupnih hipericina u drogi *Hyperici herba* izraženih kao hipericin mora biti 0,08 %, potrebno je provesti kvalitativnu i kvantitativnu analizu ekstrakata ovih dviju vrsta, osobito što se tiče sastava i sadržaja flavonoida i hiperforina budući su ti bioaktivni spojevi suodgovorni za antidepresivni učinak oficinalne droge.

*Zahvale.* – »Dio fotografija biljnih vrsta preuzete su iz diplomskih radova Dali-borke Drobnjak, mag. pharm. i Marine Gadža, mag. pharm., na čemu im se najtoplije zahvaljujemo.«



1. Bauer Petrovska B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.* 2012; 6:1–5.
2. Gonzalez-Tejero MR, Casares-Porcel M, Sanchez-Rojas CP, Ramiro-Gutierrez JM, Molero-Mesaa J, Pieroni A, Giusti ME, Censorii E, Pasquale C, Della A, Paraskeva-Hadjichambi D, Hadjichambis A, Houmanie Z, Demerdash M, Zayat M, Hmamouchig M, Johrig S. Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia. *J Ethnopharmacol.* 2008; 116:341–357.
3. Šarić-Kundalić B, Dobeš C, Klatte-Asselmeyer V, Saukel J. Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *J Ethnopharmacol.* 2011; 133:1051–1076.
4. Russo E, Scicchitano F, Whalley BJ, Mazzitello C, Ciriaco M, Esposito S, Patanè M, Upton R, Pugliese M, Chimirri S, Mammì M, Palleria C, De Sarro G. *Hypericum perforatum*: pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability, and clinical drug-drug interactions. *Phytother. Res.* 2014; 28:643–655.
5. Karioti A, Bilia AR. Hypericins as potential leads for new therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 2010; 11:562–594.
6. Kleemann B, Loos B, Scriba TJ, Lang D, Davids LM. St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) photomedicine: hypericin-photodynamic therapy induces metastatic melanoma cell death. *PLoS ONE* 2014; 9:e103762.
7. Zhang J, Shao L, Wu C, Lu H, Xu R. Hypericin-mediated photodynamic therapy induces apoptosis of myeloma SP2/0 cells depended on caspase activity in vitro. *Cancer Cell Int.* 2014; 15:58–69.
8. Robson NKB. *Hypericum* botany. In: Edzard E. (ed) *Hypericum*. London, New York: Taylor & Francis, 2003.
9. Kitanov MK. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochem. Syst. Ecol.* 2001; 29:171–178.
10. Crockett SL, Schaneberg B, Khan IA. Phytochemical profiling of new and old world *Hypericum* (St. John's wort) species. *Phytochem. Anal.* 2005; 16:479–485.
11. Marrelli M, Statti G, Conforti F, Menichini F. New potential pharmaceutical applications of *Hypericum* species. *Mini. Rev. Med. Chem.* 2015; 16:710–720.
12. European Pharmacopoeia. 5. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2005.
13. Robson NKB. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 3. Section 1. *Campylosporus* to 6a. *Umbraculoides*. *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Bot.)* 1985; 12:163–325.
14. Robson NKB. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 6. Section 20. *Myriandra* to 28. *Elodes*. *Bull. nat. Hist. Mus. Lond. (Bot.)* 1996; 26:75–217.
15. Robson NKB. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 4(2). Section 9. *Hypericum sensu lato* (part 2): subsection 1. *Hypericum series 1. Hypericum*. *Bull. nat. Hist. Mus. Lond. (Bot.)* 2002; 32:61–123.
16. Brockmann H, Haschad MN, Maier K, Pohl F. Hypericin, the photodynamically active pigment from *Hypericum perforatum*. *Naturwissenschaften* 1939; 32:550.
17. Brockmann H, Sanne W. Pseudohypericin, a new red *Hypericum* pigment. *Naturwissenschaften* 1953; 40:461.
18. Cameron DW, Raverty WD. Pseudohypericin and other phenanthroperylene quinones. *Aus. J. Chem.* 1976; 29:1523–1533.
19. Bruni R, Sacchetti G. Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). *Molecules* 2009; 14 :682–725.

20. Mauri P, Pietta P. High performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry of *Hypericum perforatum* extracts. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2000; 14:95–99.
21. Poutaraud A, Di Gregorio F, Chan Fook Tin V, Girardin P. Effect of light on hypericins contents in fresh flowering top parts and in an extract of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). Planta Med. 2001; 67:254–259.
22. Wirz A, Meier B, Sticher O. Stability of hypericin and pseudohypericin in extract solutions of *Hypericum perforatum* and in standard solutions. Pharm. Ind. 2001; 63:410–415.
23. Kubin A, Wierrani F, Burner U, Alth G, Grünberger W. Hypericin – the facts about a controversial agent. Current Pharmaceutical Design 2005; 11:233–253.
24. Falk H, Schmitzberger W. On the nature of »Soluble« hypericin in *Hypericum* species. Monatsh. Chemie. 1992; 123:731–739.
25. Sattler S, Schaefer U, Schneider W, Hoelzl J, Lehr CM. Binding, uptake and transport of hypericin by Caco-2 cell monolayers. J. Pharm. Sci. 1997; 86:1120–1126.
26. Uzdensky AB, Ma LW, Iani V, Hjortland GO, Steen HB, Moan J. Intracellular localisation of hypericin in human glioblastoma and carcinoma cell lines. Lasers Med. Sci. 2001; 16:276–283.
27. Maffi L, Benvenuti S, Fornasiero RB, Bianchi A, Melegari M. Inter-population variability of secondary metabolites in *Hypericum* spp. (Hypericaceae) of the Northern Apennines, Italy. Nord. J. Bot. 2001; 21:585–593.
28. Bagdonaite E, Janulis V, Ivanauskas L, Labokasa J. Between Species Diversity of *Hypericum perforatum* and *H. maculatum* by the content of bioactive compounds. Nat. Prod. Commun. 2012; 7:199–200.
29. Hazler Pilepić K, Maleš Ž, Crkvenčić M. Quantitative analysis of total flavonoids and total phenolic acids in thirty *Hypericum* taxa. Nat. Prod. Commun. 2013; 8:347–349.

Primljeno 26. veljače 2016.