

Određivanje količine flavonoida u nekim vrstama roda *Hypericum* L.

ŽELJAN MALEŠ, KROATA HAZLER PILEPIĆ, MAJDA ŠUŠKO

Zavod za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Determination of the content of flavonoids in some *Hypericum* L. species

Abstract – *Hypericum* L. (*Hypericaceae*) is a large genus comprising about 450 species occurring in all temperate regions of the world. Most of these species can be easily recognized by their opposite simple leaves, often containing translucent and dark reddish or black glands, and by their 5-merous yellow flowers. To date approximately 50% of taxonomically recognised *Hypericum* species have been investigated chemically.

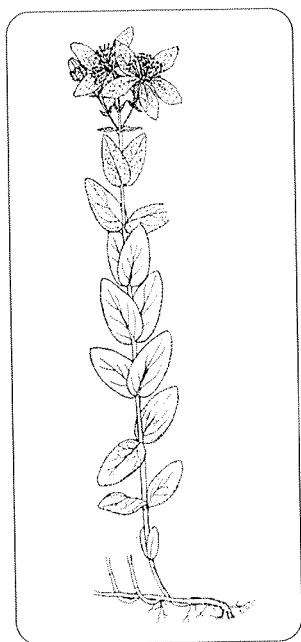
In this work determination of the content of flavonoids was carried out in the leaves, flowers and stems of *Hypericum alpigenum* Kit., *H. attenuatum* Choisy and, for comparison, from *H. perforatum* L. The content of investigated compounds was determined using spectrophotometric method. The quantity of flavonoids in the leaves was ranged from 1,66 to 1,81%, the content in the flowers was ranged from 1,13 to 1,82% and in the stems from 0,16 to 0,20%. Quantitative analysis indicated that *H. alpigenum* contained the highest amount of flavonoids in leaves and flowers in comparison with other species, while *H. perforatum* in stems.

(Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia)

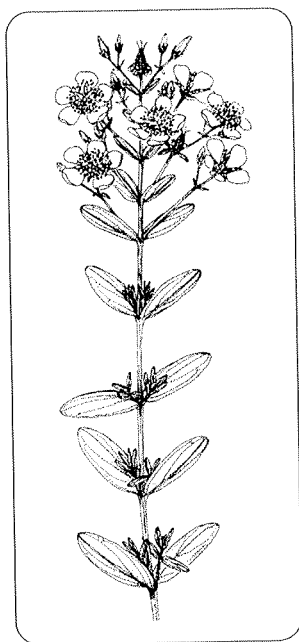
UVOD

Hypericum L. je veliki rod umjerenog klimatskog područja koji obuhvaća oko 450 vrsta (1). Iako je rod dosad bio svrstavan u porodice *Guttiferae* ili *Clusiaceae*, prema najnovijoj klasifikaciji (2) pripada zasebnoj porodici *Hypericaceae*. Naziv *hypericum* potječe od grčkih riječi *eikon* (utvara, zlo priviđenje, slika) i *hyper* (iznad), jer je biljka (vjerojatno *H. perforatum* L. – rupičasta pljuskavica) od davnina imala važno religijsko značenje: vjerovalo se da tjera zle sile. Sve vrste toga roda prepoznatljive su po žutim pentamernim cvjetovima i nasuprotnim listovima na kojima su često vidljive crne i/ili prozirne žlijezdice. Tri vrste koje su proučavane u ovom radu *H. alpigenum* Kit., *H. attenuatum* Choisy i *H. perforatum* L. također posjeduju nabrojena morfološka svojstva, ali se razlikuju u brojnim

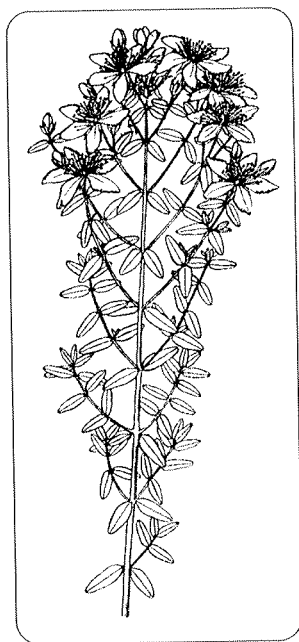
detaljima. Vrsta *H. alpigenum* Kit. [syn. *H. richeri* Vill subsp. *grisebachii* (Boiss.) Nyman], istočnojadranska podvrsta apeninske vrste *H. richeri* Vill, nerazgranata je trajnica visine do 60 cm s listovima u križno-nasuprotnom rasporedu i velikim cvjetovima (slika 1.). *H. attenuatum* Choisy azijska je razgranata višegodišnjica do 70 cm visine s poleglim i uspravnim stabljikama te brojnim sitnijim cvjetovima skupljenim u paštaste cvatove (slika 2.). Zbog ljekovitih svojstava najpoznatija, ali i najčešća kozmopolitiska vrsta je *H. perforatum* L. (slike 3. i 4.). Morfologijom je vrlo slična vrsti *H. attenuatum* te se dugo smatralo da je nastala križanjem te azijske vrste s europskom *H. maculatum* Crantz na području preklapanja njihovih areala u zapadnoj Aziji (1). No najnovija molekularna istraživanja pobijaju tu teoriju i dokazuju da vrste *H. perforatum* i *H. attenuatum* uopće nisu u toj mjeri srodne (3, 4).



Slika 1. *Hypericum alpigenum* L. (18)



Slika 2. *Hypericum attenuatum* Choisy (16)



Slika 3. *Hypericum perforatum* L. (16)

U vrstama roda *Hypericum* najčešće zastupljeni sekundarni metaboliti su različiti polifenoli. S farmaceutske stanovišta najzanimljiviji naftodiantroni, od kojih su najvažniji hipericin i pseudohipericin, pronađeni su dosad samo u četvrtini pripadnika toga roda. Najpoznatija vrsta bogata tim spojevima je *H. perforatum* – rupičasta pljuskavica, koja je najtemeljitiše istražena vrsta toga roda što se tiče kemijskog sastava i biološke aktivnosti te su njezini pripravci prihvaćeni i u službenoj medicini kao neosporno djelotvoran i dobro podnošljiv psihofarmak – antidepresiv (5–8). Od ostalih polifenola vrste toga roda bogate



Slika 4. Cvjetovi vrste *Hypericum perforatum* L.

su floriglucinolnim derivatom hiperforinom, brojnim i raznolikim flavonolnim glikozidima i aglikonima (npr. rutin, hiperozid, izokvercitrin, kvercitrin i kvercetin) te biflavonom amentoflavonom (9, 10). Velik broj vrsta sadrži eterično ulje iako u vrlo malim količinama (11–14). Važno je spomenuti da je kompletan kemijski sastav dosad utvrđen samo za polovinu toga vrstama bogatog roda. Kao mali doprinos poznavanju kemijskog sastava vrsta toga roda provedeno je i ovo istraživanje čiji je cilj spektrofotometrijsko određivanje i usporedba količine flavonoida u listovima, cvjetovima i stabljikama hrvatske autohtone vrste *H. alpigenum* i azijske vrste *H. attenuatum* u usporedbi s vrstom *H. perforatum*.

EKSPERIMENTALNI DIO

Materijal za istraživanje

Materijal za istraživanje sastojao se od usitnjenih listova, cvjetova i stabljika vrste *H. alpigenum*, sabrane na Risnjaku (10.7.2006.), vrste *H. perforatum*, sabrane u okolici Poreča (23.6.2006.) dok je vrsta *H. attenuatum* uzgojena u Farmaceutskom botaničkom vrtu »Fran Kušan«.

1. Identifikacija biljnog materijala

Identitet istražene biljne vrste izvršen je u Zavodu za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i potvrđen ispitivanjem vanjske i unutarnje građe skupljenih uzoraka (15, 16).

2. Određivanje količine flavonoida

Za određivanje količine flavonoida primjenjena je spektrofotometrijska metoda prema Christu i Mülleru (17). Količine flavonoida u svim uzorcima određene su tri puta, a iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

Za mjerenje apsorbancija pri određivanju flavonoida uporabljen je UV-VIS spektrofotometar Varian Cary 50 Bio (proizvod tvrtke Varian Inc., SAD) Zavoda za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati kvantitativne analize flavonoida prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Sadržaj flavonoida – w (%)^a u ispitivanim uzorcima

UZORAK	LIST	CVIJET	STABLJIKA
<i>Hypericum alpigenum</i>	1,81 ± 0,02	1,82 ± 0,01	0,16 ± 0,01
<i>Hypericum attenuatum</i>	1,69 ± 0,09	1,13 ± 0,02	0,16 ± 0,01
<i>Hypericum perforatum</i>	1,66 ± 0,02	1,25 ± 0,01	0,20 ± 0,01

a = $\bar{x} \pm SD$ (n = 3)

Istraživanjem je utvrđeno da je količina flavonoida u uzorcima listova između 1,66 i 1,81%, u uzorcima cvjetova između 1,13 i 1,82%, dok su uzorci stabljika sadržavali od 0,16 do 0,20% flavonoida. Uspoređujući pojedine vrste utvrđeno je da vrsta *H. alpigenum* sadrži najveću količinu flavonoida u listovima i cvjetovima, a vrsta *H. perforatum* u stabljikama.

ZAKLJUČAK

U ovom je radu spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru određena količina flavonoida u listovima, cvjetovima i stabljikama sljedećih vrsta roda *Hypericum*: *H. alpigenum*, *H. attenuatum* i *H. perforatum*. Dobivene vrijednosti uspoređene su između pojedinih vrsta i pojedinih biljnih dijelova. Utvrđeno je da je količina flavonoida u uzorcima listova od 1,66 do 1,81%, u uzorcima cvjetova od 1,13 do 1,82%, a u uzorcima stabljika od 0,16 do 0,20%. Uspoređujući pojedine vrste utvrđeno je da vrsta *H. alpigenum* sadrži najveću količinu flavonoida u listovima i cvjetovima, a vrsta *H. perforatum* u stabljikama.

Zahvala. – »Prikazani rezultati proizašli su iz znanstvenog projekta (Farmakobotanička i kemijska karakterizacija cvjetnica hrvatske flore), provedenog uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.»

Literatura – References

1. Robson NKB. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). 2. Characters of the genus. Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Bot. 1981; 8:55–226.
2. APG II (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. Bot. J. Linn. Soc. 2003; 141:399–436.

3. Brutovská R, Čellárová E, Schubert I. Cytogenetic characterization of three *Hypericum* species by in situ hybridization. *Theor Appl Genet.* 2000; 101: 46–50.
4. Hazler Pilepić K, Morović M, Orač F, Šantor M, Vejinović V. *Biologia (Bratislava)* 2010; 65:805–812.
5. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 2001; 53:583–600.
6. Greeson JM, Sanford B, Monti D. St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of the current pharmacological, toxicological and clinical literature. *Psychopharmacology.* 2001; 153:402–414.
7. Verotta L. *Hypericum perforatum*, a source of neuroactive lead structures. *Curr Top Med Chem.* 2003; 3:187–201.
8. Butterweck V. Mechanism of action in St. John's Wort in depressions. What is known? *CNS Drugs.* 2003; 17:539–562.
9. 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.
10. Bruni R, Sacchetti G. Factors Affecting Biosynthesis in Wild and Field Grown St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). *Molecules* 2009; 14:682–725.
11. Demirci B, Baser HC, Crockett SL, Khan IA. Analysis of the volatile constituents of Asian *Hypericum* L. (Clusiaceae, Hyperidoideae) species. *J. Essent. Oil Res.* 2005; 17:659–663.
12. Crockett SL, Demirci B, Baser HC, Khan IA. Analysis of the volatile constituents of five African and Mediterranean *Hypericum* L. (Clusiaceae, Hyperidoideae) species. *J. Essent. Oil Res.* 2007; 19:302–306.
13. Crockett SL, Demirci B, Baser HC, Khan IA. Volatile constituents of *Hypericum* L. section *Myriandra* (Clusiaceae): species of the *H. fasciculatum* Lam. alliance. *J. Essent. Oil Res.* 2008; 20:244–249.
14. Nogueira T, Marcelo-Curto MJ, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Rubiolo P, Biechi C. Chemotaxonomy of *Hypericum* genus from Portugal: Geographical distribution and essential oils composition of *Hypericum perforatum*, *Hypericum humifusum*, *Hypericum linariifolium* and *Hypericum pulchrum*. *Biochem. Syst. Ecol.* 2008; 36:40–50.
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. Robson NKB. *Hypericum* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (eds). *Flora Europaea* Vol 2. London, New York, Melbourne: Cambridge University Press, 1968.
17. Christ B, Müller KH. Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. *Arch. Pharm.* 1960; 293:1033–1042.
18. Jávorka S, Csapody V. Iconography of the flora from the south-eastern part of Central Europe. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1975.