

Bazı *Hypericum* Türlerinde Hiperisin ve Tanen Miktar Tayinleri

M. Koray SAKAR (*)
Rolf ENGELSHOWE (**)

Özet: Araştırılan 8 *Hypericum* türü ve 2 varyetesinde "kırmızı pigment" (hiperisin ve psödohiperisin) miktarı spektrofotometrik yöntemle hiperisin üzerinden hesaplanmıştır. Bitkisel materyaldaki (çiçek ve yaprak) hiperisin miktarı 142-810 mg/kg arasındadır. *H. calycinum* "kırmızı pigment" içermemektedir. En yüksek hiperisin miktarı ise *H. montbretii*'nin çiçek ve yapraklarında bulunmuştur (810 mg/kg). Tanen miktar tayini EngelHermann'a göre "deri tozu metodu" ve ardından iyodometrik titrasyonla yapılmıştır. En yüksek tanen miktarı *H. calycinum* çiçeklerinde (% 15.29) bulunmuştur. Bitkisel materyallerdeki tanen miktarı % 4.27 ile % 15.29 arasındadır.

GEHALTSBESTIMMUNGEN VON HYPERICIN UND GERBSTOFFEN IN EINIGEN HYPERICUM-ARTEN

Zusammenfassung: Der Gehalt an "rotem Pigment" (*Hypericin* und *Pseudohypericin*) wurde spektrophotometrisch an 8 verschiedenen *Hypericum*-Arten und 2 verschiedenen *Hypericum*-Varietäten untersucht. Die Berechnung erfolgt als *Hypericin*. Der *Hypericin* gehalt in Blüten und Blättern liegt zwischen 142 und 810 mg/kg. *H. calycinum* enthält keine "roten Pigmente". Den höchsten *Hypericingehalt* ergeben Blätter und Blüten von *H. montbretii* (810 mg/kg). Die Gerbstoffgehaltsbestimmung wurde nach EngelHermann nach der "Hauptpulvermethode" und anschließender jodometrischer Titration durchgeführt. Den höchsten Gerbstoffgehalt lieferte die Blüten von *H. calycinum* (15.29 %). Die Gerbstoffgehalt lagen in den Pflanzenmaterialien zwischen 4.27 und 15.29 %.

Schlüsselwörter: *Hypericum species*; Gehaltsbestimmung, *Hypericin*, Gerbstoffe.

Başvuru Tarihi: 24.3.1989

Kabul Tarihi: 9.8.1989

(*) H.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 06100-Ankara.

(**) Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie der Universität Münster, 44 Münster, BRD.

EINLEITUNG

Innerhalb der Gattung *Hypericum* ist *Hypericum perforatum* L. eine weit verbreitete Heilpflanze. Sie wird u.a. als Wundheilmittel bei Brand und Risswunden verwendet. Es wurden antimikrobielle Eigenschaften von *Hypericum perforatum* und anderen Arten nachgewiesen (1). Ein bedeutenderes Anwendungsgebiet des Krautes von *Hypericum perforatum* ist die Therapie der vegetativen Dystonie bei depressiver Stimmungslage (2). Die antidepressive Wirksamkeit der Droge wird dem Hypericin zugeschrieben (3). Es wurde jedoch in letzter Zeit berichtet, dass Johanniskraut genotoxisch d.h. mutagen und möglicherweise kanzerogen wirksam ist und dass dieser Effekts durch den Quercetingehalt bedingt wird (4). Die Gehaltsbestimmung des Hypericins in *Hypericum*-Arten kann durch Photometrie (5-8), durch DC-Densitometrie (9) und durch HPLC (10) erfolgen. Die Gerbstoffgehaltsbestimmung wird auf verschiedene Weise durchgeführt (11-13). Die Eigenschaft der Gerbstoffe und deren Vorstufen sich an Hautpulver binden zu lassen, liegt vielen Bestimmungsverfahren zugrunde.

In dieser Arbeit wurde die Gehaltsbestimmung des Hypericins spektrofotometrisch durchgeführt (5). Die Gerbstoffgehaltsbestimmung wurde nach der "Hautpulvermethode" mit anschließender jodometrischen Titration vorgenommen (11).

Material und Methoden

Das Pflanzenmaterial wurde an an-

gegebenen Orten und zu den angegebenen Zeiten gesammelt.

Hypericum perforatum L., in der Nähe von Bursa, im Juli 1985.

H. organifolium Willd., in der Nähe von Afyonkarahisar, im Juni 1985.

H. salsugineum Robson, Hub.-Mor., bei Gölyazı, Konya, im Juni 1985.

H. lanuginosum Lam. var. *lanuginosum*, bei Gözne, İçel im Juli 1986.

H. aviculariifolium Jaub., Spach subsp. *aviculariifolium* var. *aviculariifolium*, bei Köyceğiz, Muğla, im Juli 1986.

H. aviculariifolium Jaub. Spach subsp. *aviculariifolium* var. *albiflorum*, in der Nähe von Muğla, im Juli 1986.

H. triquetrifolium Turra, bei Gemlik, Bursa, im August 1986.

H. montbretii Spach, bei Doğançay, Adapazarı, im Juni 1986.

H. calycinum L., bei Doğançay, Adapazarı, im Juni 1986.

Gehaltsbestimmung von Hypericin

Die Luftgetrocknete Droge wird bei 45°C im Trockenschrank nachgetrocknet und gepulvert. 10.0 g getrocknetes Drogenpulver werden im Soxhletapparat mit 200 ml Chloroform erschöpfend extrahiert; die Chloroformphase wird verworfen. Nach Chloroformextraktion wird das Drogenmaterial bei 50°C getrocknet und anschließend mit Methanol unter Zusatz von 3 % Pyridin (V/V) ebenfalls im Soxhlet erschöpfend ausgezogen. Der Pyridin-Methanol-Auszug

wird nach dem Erkalten durch Watte in einem 100 ml Messkolben filtriert und mit dem pyridinhaltigen Methanol wird nach Ausspülen des Extraktionskolbens und des Trichters mit dem pyridinhaltigen Methanol bis auf 100.0 ml aufgefüllt. Gegebenenfalls wird der Extrakt mit pyridinhaltigem Methanol verdünnt. Die Extinktion des gefärbten Filtrats wird bei 1 cm Schichtdicke bei 590 nm gegen eine Blindlösung (pyridinhaltiges Methanol) gemessen. Der Hypericingehalt der Lösung wird dann aus einer Eichkurve ermittelt und auf 1000 g wasserfreies Ausgangsmaterial berechnet. Zur Aufstellung der Eichkurve werden 0.5 bis 3 mg reines kristallines Hypericin (C. Roth) in 100.0 ml pyridinhaltigem Methanol (3 % V/V) gelöst und bei einer Schichtdicke von 1 cm bei 590 nm in einem Hitachi UV-120 Spektrofotometer vermessen.

<u>Hypericin-Konzentration</u>	<u>Extinktion</u>
0.5 mg in 100 ml	0.189
1.0 mg in 100 ml	0.387
1.5 mg in 100 ml	0.561
2.5 mg in 100 ml	0.947
3.0 mg in 100 ml	1.144

DC von Hypericin und Pseudohypericin

Untersuchungslösung: 1.0 g Droge werden mit 20 ml Methanol 5 min einer Wirbelextraktion unterzogen; der Extrakt wird durch Watte filtriert, das Filtrat zur Trockene eingengt und der Rückstand in 1 ml Methanol aufgenommen.

Adsorbens: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatte

Fliessmittel: Ameisensäureäthylester-Ameisensäure-Toluol (40-10-50)

Detektion: a) unter UV 365 nm

b) Pyridinreagenz besprüht, rot fluoreszierende Zonen Hypericin Rf=0.70 und Pseudohypericin Rf=0.63

Gehaltsbestimmung der Gerbstoffe

Zur Gerbstoffbestimmung wurde das "Hautpulververfahren" (nach Enge/Hermann) kombiniert mit anschließender jodometrischer Titration durchgeführt (11). Dem ermittelten "Jodwert" hinzuziehen ist die Menge 0.1 N Jodlösung, die von wasserlöslichen Anteilen des Hautpulvers gebunden werden. Sie betragen nach unseren Untersuchungen für 3.0 g Hautpulver (mit 50 ml Wasser und für 10 ml Filtrat) 0.2 ml 0.1 N Jodlösung.

Die Berechnung des Gerbstoffgehaltes erfolgt nach folgender Formel:

Formel:

$$\% \text{ Gehalt an Gerbstoffen} = \frac{\text{Verbrauch ml } 0.1 \text{ N Jodlösung} \times 1.71}{\text{Drogeeinwaage in g}}$$

Verbrauch ml 0.1 N Jodlösung	= Verbrauch ml 0.1 N - Verbrauch ml Jodlösung (gerbstoffhaltiger) (Extrakt)	0.1 N Jodlösung ("entgerbt") (Extrakt)
= Ergebnis + 0.2 ml 0.1 N Jodlösung		

Ergebnis und Diskussion

Vor der spektrofotometrischen Bestimmung des Hypericingehaltes wurden aus den fein zermahlenden Pflanzenteilen (Blüten und Blätter) zunächst Chlorophyll und Carotinoide im Soxhletapparat mit Chloroform extrahiert. Anschliessend wurde die Droge erschöpfend mit pyridinhaltigem Methanol (3 % V/V) ausgezogen.

Hypericin zeigt in pyridinhaltigem Methanol bei 590 nm ein ausgeprägtes Absorptions-maximum, was zur spektrofotometrischen Auswertung geeignet ist. Das Pseudohypericin wurde nach diesem Verfahren als Hypericin miterfasst, da es ein gleiches Absorptionsverhalten wie das Hypericin zeigt. Untersucht wurde die oberirdischen Teile (Blätter und Blüten) von 9 verschiedenen *Hypericum*-Arten. Das Ergebnis zeigte, dass in *Hypericum*-Arten zwischen 142 und 810 mg/kg "rotes Pigment" enthalten sind; mit Ausnahme von *H. calycinum*, was kein "rotes Pigment" enthält (siehe Tabelle I). Der höchste Hypericingehalt mit 810 mg/kg wurde in *H. montbretii* (Blätter und Blüten) gefunden.

Die DC Auswertung ergab, dass in

allen untersuchten Drogenmustern als "rotes Pigment" sowohl Hypericin als auch Pseudohypericin enthalten sind (Ausnahme: *H. calycinum*).

Die eigenen Voruntersuchungen an Gerbstoffen und Gerbstoffvorstufen und auch die Literaturangaben ergaben, dass in *Hypericum*-Arten hauptsächlich kondensierte Gerbstoffe und Dephidone enthalten sind (14-18). Die Gerbstoffgehalte der untersuchten *Hypericum*-Arten (Blüten und Blätter) lagen zwischen 4.27 und 15.29 %.

Der höchste Gerbstoffgehalt wurde in den Blüten von *H. calycinum* (15,29 %) gefunden (s. Tabelle II).

Danksagung: Für die Bestimmung des Pflanzenmaterials wird a Herrn Assoc. Prof. Dr. S. Tokur an der Universität Anadolu in Eskişehir gedankt.

Tabelle I - Roh - Hypericin aus verschiedenen *Hypericum*- Arten

Species	Hypericin + Pseudohypericin in mg/kg getrockneten Drogen (Blüten und Blätter)		Im Rohfarbstoff anwesend Hypericin	
		Pseudo- Hypericin		
<i>Hypericum origanifolium</i>	142	+	+	
<i>H. perforatum</i>	157	+	+	
<i>H. salsugineum</i>	348	+	+	
<i>H. lanuginosum</i> var. <i>lanuginosum</i>	248	+	+	
<i>H. avicularifolium</i> subsp. <i>aviculariifolium</i> var. <i>aviculariifolium</i>	221	+	+	
<i>H. aviculariifolium</i> subsp. <i>aviculariifolium</i> var. <i>albiflorum</i>	223	+	+	
<i>H. triquetrifolium</i>	157	+	+	
<i>H. montbretii</i>	810	+	+	
<i>H. calycinum</i>	-	-		

Tabelle II: Gerbstoffgehalte aus verschiedenen Hypericum-Arten

Species	Gerbstoffe in g/100 getrockneter Drogen (Blüten und Blätter)
<i>Hypericum origanifolium</i>	4.27
<i>H. perforatum</i> (Blüten)	4.61
<i>H. perforatum</i> (Blätter)	6.67
<i>H. salsugineum</i>	6.65
<i>H. lanuginosum</i> var. <i>lanuginosum</i>	4.61
<i>H. aviculariifolium</i> subs. <i>aviculariifolium</i> var. <i>aviculariifolium</i>	5.30
<i>H. aviculariifolium</i> subsp. <i>aviculariifolium</i> var. <i>albiflorum</i>	7.52
<i>H. triquetrifolium</i>	4.62
<i>H. montbretii</i>	4.44
<i>H. calycinum</i> (Blüten)	15.29
(Blätter)	9.92

LITERATUR

1. Sakar, M., Tamer, A.Ü., Tokur, S., "Antimicrobial activities of some *Hypericum* species growing in Turkey" *Fitoterapia*, 59 (1), 49-52 (1988).
2. Schindler, H., "Compounds contained in medicinal drugs and methods of assay of plant tinctures", *Arzneimittel Forsch.* 4, 401-403 (1954).
3. Wagner, H., "Pharmazeutische Biologie; Drogen und ihre Inhaltsstoffe", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart New York, (1980).
4. Poginsky, B., Westendorf, J., Prosenc, N., Kuppe, M., Marquardt, H., "Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.), Genotoxizität bedingt durch den Quercetingehalt" *DAZ*, 26, 1364-64, (1988).
5. Neuwald, F., Hagenström, U., "Die photometrische Bestimmung des Hypericingehaltes in *Herba Hyperici*", *Arch. Pharm.*, 288, 38-42, (1955).
6. Brockmann, H., Phol, F., Maier, K., Haschaad, M.N., "Hypericin, the photodynamic pigment of *St. John's-bread*", *Annalen der Chemie*, 553, 1-52, (1942).
7. Deutscher Arzneimittel Codex 1979.
8. Brockmann, H., Sanne, W., "Zur Kenntnis des Hypericins und Pseudohypericins", *Chem. Ber.*, 2408-91, (1957).
9. Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastre, R., "Quantitative determination of biologically active constituents in medicinal plants crude extracts by thin layer chromatography densitometry", **J.**

Chromatography, 281, 263-71, (1983).

10. Freytag, E., "Bestimmung von Hypericin und Nachweis von Pseudohypericin in *Hypericum perforatum* L. durch HPLC", *DAZ*, 124 (46), 238-86, (1984).

11. Enge, W., Hermann, K., "Über Rhizoma Tormentillae und die Besändigkeit des Gerbstoffe in der Drogen", *Pharmazie*, 12, 162-68, (1957).

12. Glasl, H., "Zur Photometrie in den Drogenstandardisierung; 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffen", *DAZ*, 123. (42), 1979-87, (1983).

13. Stahl, E., Schild, W., "Pharmazeutische Biologie, Drogenanalyse II", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, (1981).

14. Harborne, J.B., "Phytochemical

Methods", Chapman and Hall, London, New York, (1984).

15. Sakar, M.K., Engelshowe, R., "Struktur der Gerbstoffvorstufen in der Rinde von *Thuja occidentalis* L.", *Acta. Pharm. Turc. (Istanbul)*, 29, 21-8, (1987).

16. Polezhaeva, N.S., Kanyuchkova, G.K., "Content of flavonoids, tannins and carotenoids in *Hypericum maculatum*", *Rastit. Resur.* 21 (3), 340-3, (1985).

17. Prokosheva, L.I., Shatunova, L.V., "Contents of active substances in the above ground parts of *Hypericum perforatum*", *Rastit. Resur.* 21 (4), 461-3, (1985).

18. Kitanov, G., "Phytochemistry of Bulgaria species of genus *Hypericum*. III. Quantitative determination of tannins", *Fatmatsiya (Sofia)*, 37 (3), 24-9, (1987).

Ayakkabım yok diye üzülürken, ayaksız bir adam gördüm.

ARAP ATASÖZÜ