

EKSPERIMENTINIAI TYRIMAI

Paprastosios jonažolės (*Hypericum perforatum L.*) veikliųjų medžiagų kiekybinė analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

Saulius Kazlauskas, Edita Bagdonaitė¹

Kauno medicinos universitetas, ¹Vilniaus botanikos institutas

Raktažodžiai: efektyvioji skysčių chromatografija, flavonoidai, hipericinas, paprastoji jonažolė.

Santrauka. Pagrindinės jonažolės veikliosios medžiagos yra flavonoidai (rutinas, kvercetas ir izokvercetas) ir hipericinas. Šios medžiagos teigiamai veikia žmogaus ląstelių regeneraciją, pasižymi priešuždegiminėmis ir priešvirusinėmis savybėmis. Hipericinas veikia kaip antidepresantas.

Straipsnyje pateikiamas paprastosios jonažolės, surinktos natūraliose augavietėse ir kolekcinių pavyzdžių, vaistinės žaliavos veikliųjų medžiagų kiekybinis įvertinimas didelio slėgio skystinės chromatografijos metodu. Taip pat apžvelgiami hipericino ir flavonoidų kiekio kitimo dėsningumai augimvietėse ir augavietėse, žieduose ir lapuose, augimo fenofazėse.

Augalinė žaliava tyrimams surinkta 1998–1999 m. Aktyviųjų medžiagų kiekybinis nustatymas buvo atliekamas efektyviosios skysčių chromatografijos metodu naudojant UV detektorius.

Didžiausi kiekiai rutino rasti lapuose, o kvercetino, izokvercetino ir hipericino – žieduose. Nustatyta, kad žydėjimo laikotarpiu jonažolėje susikaupia didesni veikliųjų medžiagų kiekiai.

Įvadas

Paprastoji jonažolė (*Hypericum perforatum L.*) – jonažolinių (*Hypericaceae*) šeimos daugiametis, 30–100 cm aukščio, žolinis augalas. Stiebas stačias su dviem išilginėmis briaunomis šonuose. Lapai priešiniai, bekočiai, lygiakraščiai, juose daug persišviečiamų liaukinių taškelių ir nedaug juodų. Žiedai susitelkę skydiškų šluotelių pavidalo žiedynuose. Taurėlapiai siauri, lancetiški. Vainiklapiai tamsiai geltoni, nelygiašoniai. Vaisius – trilizdė tamsiai ruda dėžutė (1). Vaistinei žaliai vartojamos 15–30 cm viršūnės (*Herba Hyperici*), nupjautos augalo žydėjimo laikotarpiu – birželio ir liepos mėnesiais.

Jonažolės preparatams būdingas regeneruojantis, dezinfekuojantis, priešuždegiminis, antivirusinis veikimas. Gydo žaizdas, opaligę, kepenų ligas, stabdo dantenu kraujavimą (2). Jau gerai ištirtas ir antidepresinis jonažolės veikimas. Nustatyta, kad jonažolės preparatai rečiau sukelia šalutinių reiškinių negu sintetiniai vaistai (3, 4).

Jonažolės platus veikimas priklauso nuo sintetinių medžiagų kiekio. Standartizuojant augalinę žaliavą, tradiciškai dėmesys kreipiamas į du naftodiantonus: hipericiną ir pseudohipericiną. Jų suma ekstrak-

te siekia 0,1–0,3 proc. Ne mažiau svarbūs flavonoidai (kvercetas, rutinas, hiperozidas, izokvercitrinas, kvercitrinas) sudaro apie 2–4 proc., o floriglucinolai (hiperforinas, pseudohiperforinas) ~1–6 proc. (5, 6).

Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad veikliųjų medžiagų kiekis, o kartu ir vaistinės žaliavos kokybė priklauso nuo daugelio veiksnių: natūralios augavietės ir augimvietės, augalo genetinių savybių, augimo fazės, augalo organo, augalinės žaliavos rinkimo laiko, džiovavimo ir kt. (7–9).

Šio tyrimo tikslas – paprastosios jonažolės veikliųjų medžiagų kiekio ir kitimo dėsningumą įvertinimas didelio slėgio skysčių chromatografijos metodu.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Tyrimo medžiaga surinkta 1998–1999 m. natūraliose paprastosios jonažolės augavietėse ekspedicijų metu ir Botanikos instituto Eksperimentinėje mokslinėje bazėje vaistinių ir aromatinių augalų kolekcijoje. Koordinatės: N 54°46'39.3", E 025°17'27.2" (1 lentelė).

Kolekcijoje augalinė žaliava buvo renkama vegetacinio laikotarpio pabaigoje (1999 06 14). Žiedų ir lapų pavyzdžiai džiovinti kambario temperatūroje. Augali-

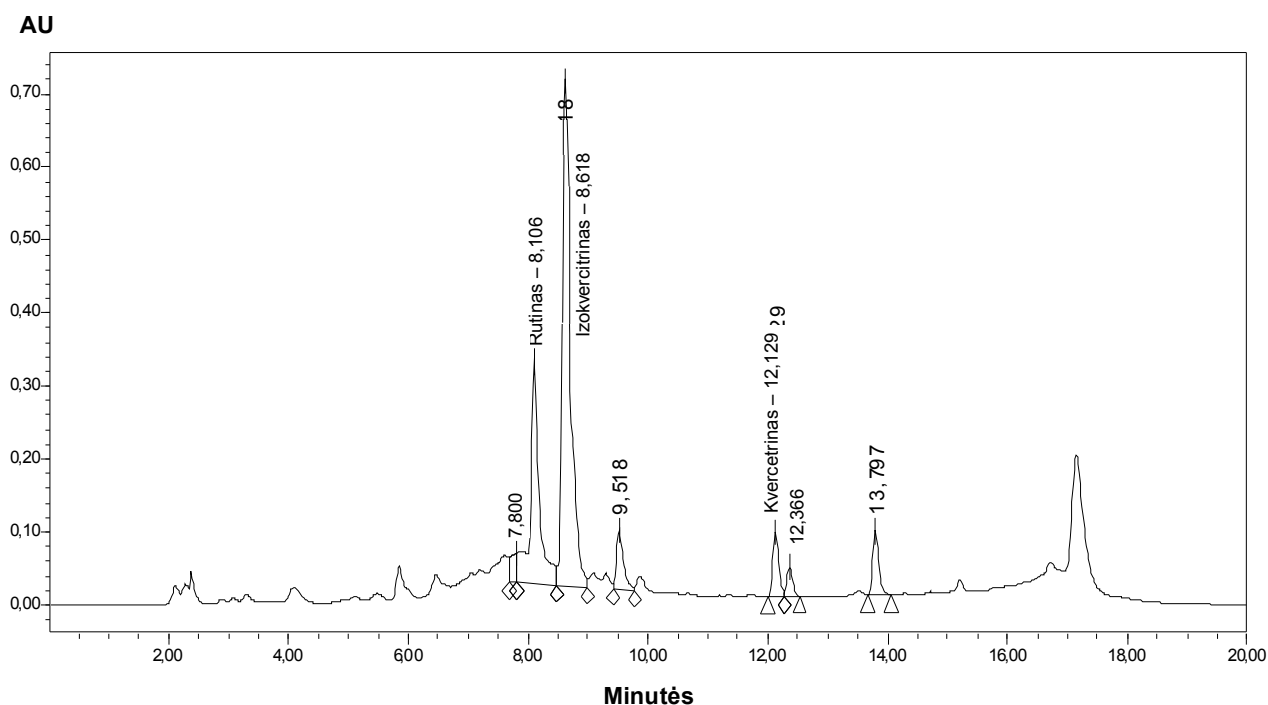
1 lentelė. Paprastosios jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) tyrimo medžiagos rinkimo charakteristika

Nr.	Radimo vieta	Koordinatės	Augavietė	Rinkimo laikas
1	Marijampolės raj., Sasnavos g-ja, 65 kv.	–	Pieva	99 07 02
2	Kauno raj., Kauno marių regioninis parkas	N 54°48'48.7" E 024°10'51.0"	Vidutinio drėgnumo pieva	99 07 02
3	Prienuj raj., Prienuj šilas, 83 kv.	N 54°35'31.6" E 023°55'22.1"	Kirtimas	99 07 02
4	Alytaus raj., Daugai	N 54°21'27.0" E 024°15'09.8"	Dirvonas	99 07 03
5	Kėdainių raj., Pašiliai	N 55°29'32.4" E 024°13'00.3"	Dirvonas	99 07 13
6	Kėdainių raj., Truskava	N 55°27'22.0" E 024°13'59.2"	Dirvonas	99 07 13
7	Anykščių raj., Troškūnai	N 55°34'56.2" E 025°00'00.9"	Dirvonas	99 07 14
8	Utenos raj., Tauragnai	N 55°25'35.1" E 026°01'35.4"	Dirvonas	99 07 17
9	Zarasų raj., Davainiai	N 55°43'03.4" E 025°43'00.4"	Dirvonas	99 07 19
10	Zarasų raj., Vosgėlių piliakalnis	N 55°43'16.4" E 025°44'59.3"	Vidutinio drėgnumo pieva	99 07 19
11	Vilniaus raj., Verkšnionių karjeras	N 54°47'34.4" E 024°54'44.9"	Karjeras	99 07 22
12	Vilniaus raj., Sudervė	N 54°48'32.4" E 024°59'23.3"	Vidutinio drėgnumo pieva	98 07 09 99 07 22
13	Vilniaus raj., Dūkštos	N 54°48'27.1" E 024°54'51.9"	Dirvonas	98 07 09 99 07 22
14	Anykščių raj., Čekonys	N 55°34'44.5" E 025°12'18.1"	Dirvonas	98 07 15 99 07 14
15	Anykščių raj., Svėdasai	N 55°39'45.7" E 025°20'06.2"	Dirvonas	98 07 15 99 07 14
16	Molėtų raj., Joniškis	N 55°05'12.5" E 025°41'19.6"	Pieva	98 07 01
17	Ignalinos raj., Krikonys	N 55°15'29.9" E 026°22'38.8"	Dirvonas	98 07 04
18	Ukmergės raj. prie Šventosios upės	–	Pieva	98 07 15
19	Utenos raj., Vyžuonių g-ja	–	Pieva	98 07 16

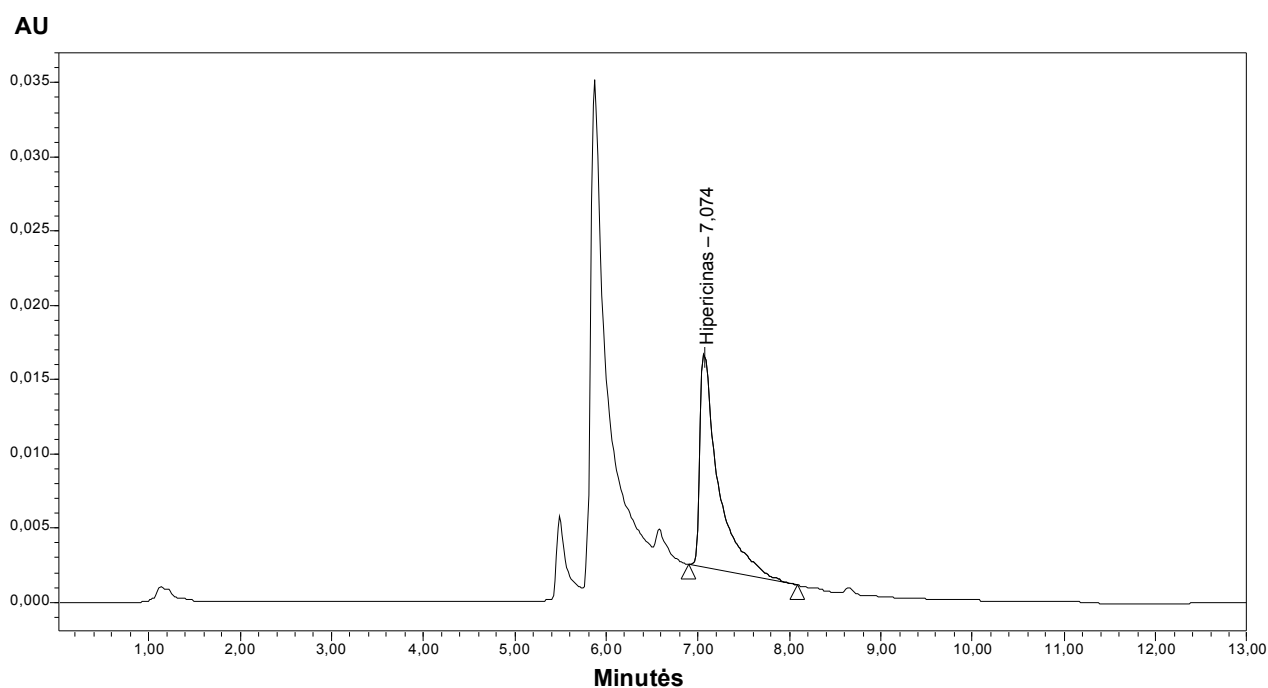
nės žaliavos ekstrakcija atlikta pagal farmakopėjinę metodiką (10). Orasausė augalinė žaliava sumalama ir tikslus jos kiekis (1 g) ekstrahuojamas apvaliadugnėje kolboje 30 ml 50 proc. etanolium. Kolba su prijungtu oro šaldytuvu šildoma 70°C temperatūroje vandens vonelėje. Po 30 min. karštas ekstraktas filtruo-

jamas į 100 ml matavimo kolbą. Filtras įstatomas atgal į apvaliadugnę kolbą ir įpilama 30 ml 50 proc. etanolio. Ekstrakcija kartojama dar du kartus. Atvėsintas ekstraktas praskiedžiamas 50 proc. etanolium iki 100 ml.

Pagrindinių veikliųjų medžiagų kiekybinę analizę ekstrakte atlikome pagal J. Holzl ir E. Ostrowski meto-



1 pav. Flavonoidų nustatymo chromatograma



2 pav. Hipericino nustatymo chromatograma

diką (11) skysčių chromatografu „Waters 2690“ su UV detektoriumi, kolonėlės – „X-Terra RP₁₈“ 3,0×150 mm (flavonoidams) ir „Nova Pak C₁₈“, 3,9×150 mm (hipericinui). Eliuavimas – gradientinis.

Flavonoidai identifikuojami 254 nm bangos ilgyje, o hipericinas – 590 nm. Chromatogramų pavyzdžiai

pateikiami pirmame ir antrame paveiksluose.

Panaudojus rutino, kvercetino, izokvercitrino ir hipericino standartus (Roth, Karlsruhe – Vokietija), sudaryti kiekybinio nustatymo grafikai. Veikliųjų medžiagų kiekiai nustatyti 66 paprastosios jonažolės lapų ir žiedų pavyzdžiuose.

2 lentelė. Veikliųjų medžiagų kiekis paprastosios jonažolės (*Hypericum perforatum* L.) augalinėje žaliavoje, mg/g

Veikliosios medžiagos	Žiedai				Lapai			
	X	$\pm S_x$	min.	maks.	X	$\pm S_x$	min.	maks.
1998								
Rutinas	9,51	0,52	7,28	11,25	14,06	0,85	9,54	16,76
Izokvercitrinas	9,38	0,40	8,19	11,32	9,79	0,75	7,21	13,24
Kvercetas	2,70	0,15	1,99	3,43	0,99	0,18	0,50	1,84
Hipericinas	0,24	0,03	0,16	0,35	0,10	0,02	0,06	0,19
1999								
Rutinas	9,68	0,30	7,73	12,44	13,45	0,73	8,91	19,09
Izokvercitrinas	9,47	0,68	4,83	16,39	8,64	0,54	3,75	11,78
Kvercetas	2,43	0,20	1,10	3,94	0,99	0,13	0,31	1,92
Hipericinas	0,26	0,03	0,04	0,37	0,13	0,02	0,03	0,27

X – vidurkis; $\pm S_x$ – vidurkio paklaida.

Rezultatai ir jų aptarimas

Paprastosios jonažolės veikliųjų medžiagų kiekybinė analizė parodė didelį jų kintamumą. Antroje lentelėje pateiktais duomenimis, daugiausia paprastosios jonažolės vaistinėje žaliavoje susikaupia rutino ir izokvercitrino.

Tyrimų duomenys rodo, kad lapuose susikaupia didesni rutino kiekiai, o žieduose žymiai daugiau susikaupia kverceto, izokvercitrino ir hipericino. Analogiškus veikliųjų medžiagų susikaupimo paprastosios jonažolės žieduose duomenis mokslinėje literatūroje yra pateikę A. Umek ir kt. (12). Literatūros duomenimis (13), rutino kiekis įvairuoja priklausomai nuo augalo organo ir augavietės. Šio tyrimo duomenys patvirtina, kad veikliųjų medžiagų kiekis įvairių augaviečių vaistinėje žaliavoje įvairuoja. 1999 m. paprastosios jonažolės žiedų ekstrakto rutino vidutinis kiekis buvo $9,68 \pm 0,30$ mg/g, izokvercitrino – $9,47 \pm 0,68$ mg/g, kverceto – $2,43 \pm 0,20$ mg/g, hipericino – $0,26 \pm 0,03$ mg/g. Didesnis už vidutinį visų veikliųjų medžiagų kiekis paprastojoje jonažolėje nustatytas trijų augaviečių (Marijampolės raj., Utenos raj., Vilniaus raj.) vaistinėje žaliavoje (3 pav.).

Kauno rajone augančių jonažolės žiedų ekstrakto nustatyti maksimalūs kverceto ($3,95$ mg/g) ir hipericino ($0,37$ mg/g) kiekiai. Tyrimų duomenimis, natūraliose augavietėse stipriausiai įvairuoja hipericino kiekis (žieduose nuo $0,04$ mg/g iki $0,37$ mg/g, o lapuose nuo $0,034$ iki $0,27$ mg/g). Didelis hipericino ir flavonoidų kiekio įvairavimas rodo jų kitimą ir priklausomumą nuo daugelio sąlygų bei suteikia galimybę atrinkti vertingus augalų bandinius.

Palyginus veikliųjų medžiagų kiekį 1998–1999 m. paprastosios jonažolės natūralių augaviečių vaistinėje žaliavoje, nustatyti panašūs rutino ir izokvercitrino kiekiai, bet dideli hipericino ir kverceto kiekio pokyčiai (4 pav.).

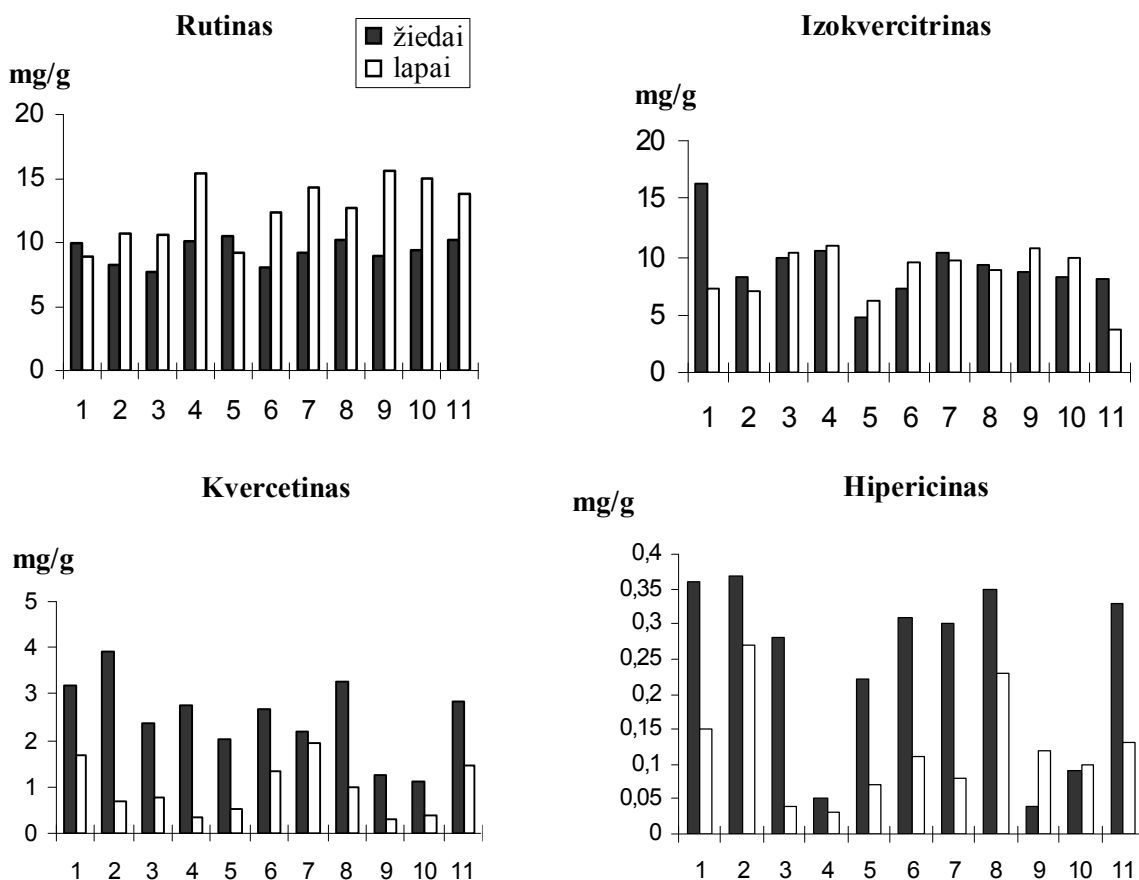
Jonažolės lapuose 1999 m. rasta vidutiniškai 50 proc., o žieduose – 29 proc. didesnis hipericino kiekis. Žieduose didėjant hipericino kiekiui, mažėja kverceto kiekis. Tarp šių medžiagų nustatyta reikšminga neigiamą koreliacija ($r = -0,62$).

Šio tyrimo duomenimis, veikliųjų medžiagų kiekiui didelės įtakos turi augalo genetinės savybės ir aplinkos veiksniai. Analizuojant flavonoidų ir hipericino susikaupimo kitimą paprastosios jonažolės kolekciniuose bandiniuose vegetacijos laikotarpiu, pastebėta, kad veikliųjų medžiagų kiekio kitimas susijęs su augalų augimo fenofazėmis. Svarbu nustatyti fazę, kurios metu jų kiekiai didžiausi ir kada tinkamiausias vaistinės žaliavos rinkimo laikas.

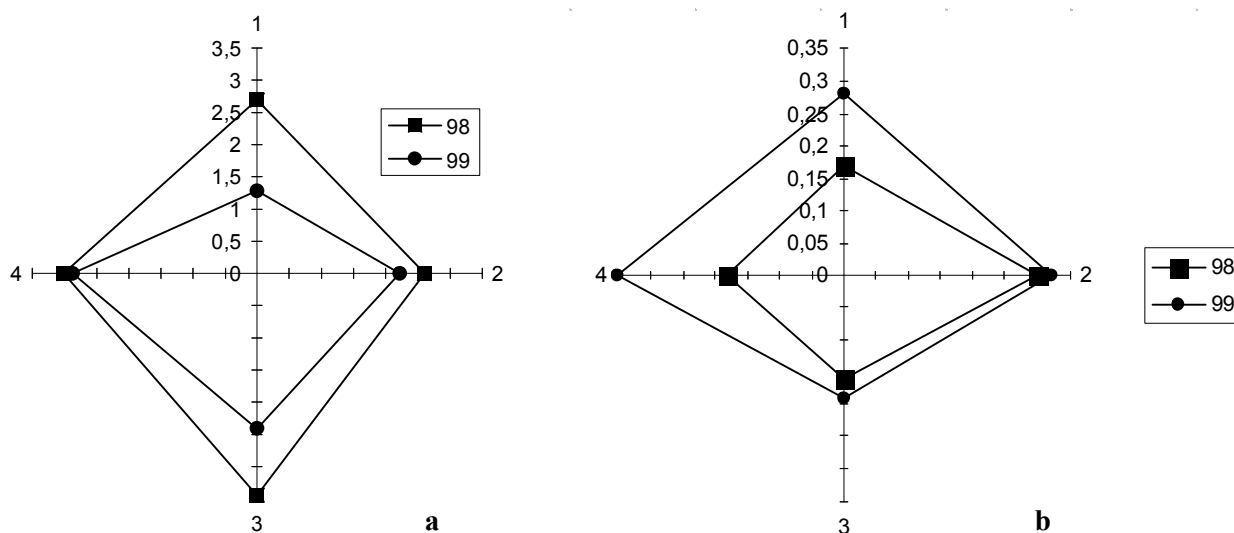
T. Kartnig ir kt. (14), tyrę paprastosios jonažolės veikliųjų medžiagų kiekio kitimą, nurodo, kad maksimalus flavonoidų kiekis susikaupia butonizacijos fazėje, o hipericino – žydėjimo fazėje.

Šio tyrimo duomenys rodo (5 pav.), kad rutino kiekis pasiekia maksimumą jau vegetacijos pabaigoje ($17,71$ mg/g – kolekcinis Nr. 334). Butonizacijos fazėje nustatytas nedidelis kiekio sumažėjimas ($15,11$ mg/g). Izokvercitrino kiekis maksimalus butonizacijos fazės metu ($10,66$ mg/g), vėliau kiekis mažėja. Mažiausiai izokvercitrino rasta lapuose žydėjimo laikotarpiu ($6,69$ mg/g).

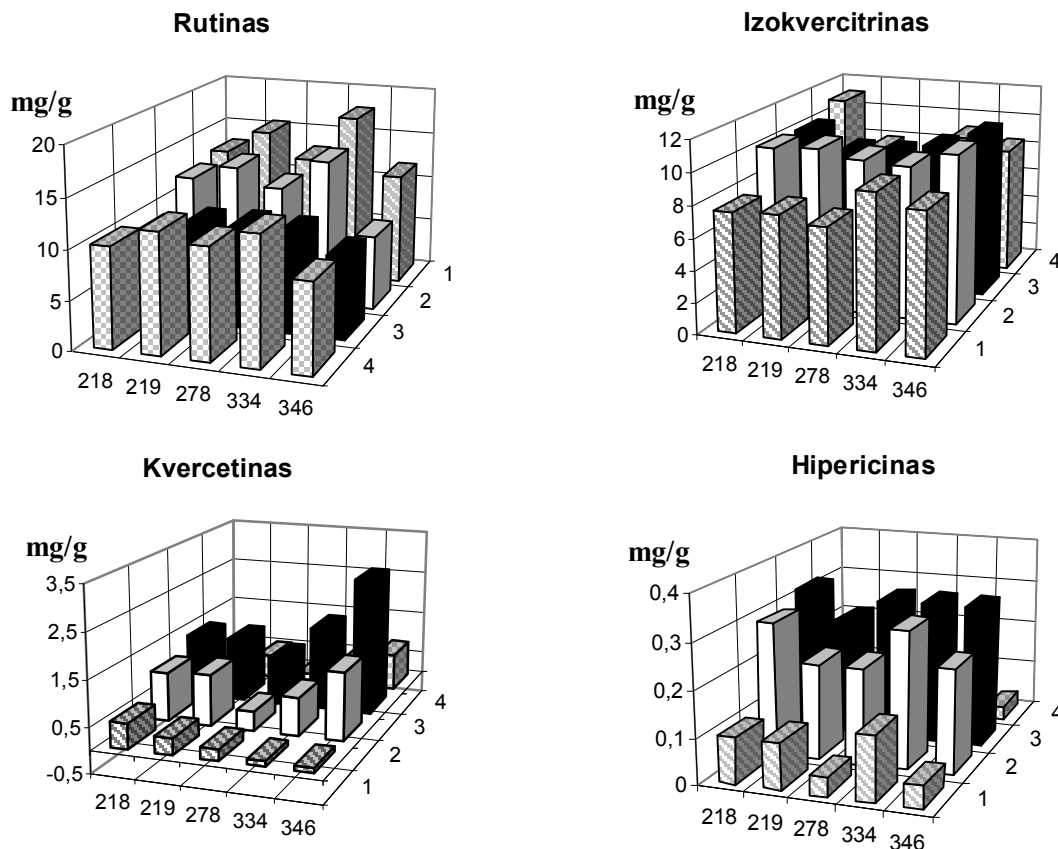
Nustatyti dideli kverceto kiekio pokyčiai ve-



3 pav. Veikliųjų medžiagų kiekiai vaistinėje žaliavoje (1–11 – augavietė, 1 lentelė)



4 pav. Kvercetino (a) ir hipericino (b) kiekio mg/g kitimas paprastosios jonažolės žieduose
1 – Vilniaus raj., Sudervė, 2 – Vilniaus raj., Dūkštos, 3 – Anykščių raj., Čekonys, 4 – Anykščių raj., Svėdasai.



5 pav. Paprastosios jonažolės kolekcinų bandinių veikliųjų medžiagų kiekio palyginimas vegetacijos laikotarpiu, 1999 m.

1 – vegetacijos fazės pabaigoje, 2 – butonizacijos fazės metu, 3 – žiedų ir 4 – lapų ekstraktuose žydėjimo fazės metu; 218, 219, 278, 334, 346 – kolekcinio bandinio nustatymo numeris.

getaciniu laikotarpiu. Vegetacijos pradžioje rastas minimalus kiekis (1,19 mg/g – kolekcinis Nr. 346). Butonizacijos fazės metu, kai pradeda formuotis žiedai, kvercetino kiekis žymiai padidėja (1,49 mg/g). Kiekio didėjimas tęsiasi iki pilno žydėjimo fazės. Žieduose susikaupia maksimalus kvercetino kiekis (3,1 mg/g).

Vegetacijos pradžioje hipericino kiekis varijuoja nuo 0,04 mg/g (kol. Nr. 278) iki 0,14 (kol. Nr. 334). Vėliau, prasidėjus butonizacijos fazei, jo kiekis intensyviai didėja ir maksimumą pasiekia liepos mėn., t. y. žydėjimo fazės metu. Pastebėta, kad šios fazės metu lapuose hipericino kiekis panašus kaip ir vegetacijos pradžioje. Kolekcijoje auginamos paprastosios jonažolės žieduose susikaupia gana didelis hipericino kiekis, kuris įvairuoja siaurame intervale (0,26–0,32 mg/g). Bandinių pernešimas į kolekciją išryškina veikliųjų medžiagų kiekio stabilumą, nes suvienodinamos augimo sąlygos.

Tyrimų duomenimis, rutino daugiausia susikaupia vegetacijos pabaigoje ir butonizacijos fazės metu, izokvercitrino – butonizacijos fazės, o kvercetino ir hipericino – žydėjimo fazės metu. Todėl tikslingiausia paprastosios jonažolės augalinę žaliavą ruošti butonizacijos ir žydėjimo fazių metu (birželio viduryje – liepos pirmoje pusėje).

Išvados

1. Nustatyta, kad paprastosios jonažolės lapuose susikaupia didesni rutino, o žieduose – kvercetino, izokvercitrino ir hipericino kiekiai.

2. Didžiausias veikliųjų medžiagų kiekis rastas butonizacijos ir žydėjimo fazių metu augalinėje žaliavoje.

3. Didelis hipericino ir flavonoidų kiekio įvairavimas natūraliose paprastosios jonažolės augavietėse suteikia galimybę atrinkti vertingus augalų bandinius vykdant tolesnę jų apsaugą lauko kolekcijoje.

Quantitative analysis of active substances in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) by the high performance liquid chromatography method

Saulius Kazlauskas, Edita Bagdonaitė¹

Kaunas University of Medicine, ¹Vilnius Botanical Institute, Lithuania

Key words: *Hypericum perforatum*, St. John's wort, flavonoids, hypericin, quantitative analysis, high performance liquid chromatography.

Summary. The flavonoids (rutin, quercetin, and isoquercetin) and hypericin are the main active substances of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). They support regeneration of human body cells, provide disinfection, and act as antidepressant, antiviral, and anti-inflammation tools. Such large spectrum of the applicable functions depends on the quantity of each substance.

The *objective* of this paper is to determine the regularities of the quantitative variation of rutin, quercetin, isoquercetin and hypericin in flowers and leaves of St. John's wort in different habitats and different plant development phases.

Plant material for the quantitative analysis was collected in 1998–1999. The high performance liquid chromatography (HPLC) was applied for the quantitative analysis of the active substances in St. John's wort. The flavonoids (rutin, quercetin, and isoquercetin) were identified under the UV waves of 254 nm, and hypericin – under the waves of 590 nm.

Larger quantities of rutin were found in leaves, while those of quercetin, isoquercetin and hypericin – in flowers of St. John's wort. The highest accumulation of active substances was observed during the development of flowering buds and in flowering time. The quantitative variation of active substances in different habitats allows the selection of the best plant samples for their cultivation and conservation in field collections.

Correspondence to S. Kazlauskas, Kaunas University of Medicine, A. Mickevičiaus 9, 44307 Kaunas, Lithuania
E-mail: saulius_kazlauskas@gama.vtu.lt

Literatūra

1. Bombardelli E, Morazzoni P. *Hypericum perforatum*. Fito-terapia 1995;66:43-68.
2. Georgievskij VP, Komissarenko NF, Dmitruk SE. Biologičeski aktivnyje veshchestva lekarstvennykh rastenij. (Biologically active substances of the medical plants.) Novosibirsk; 1990. p. 238-40.
3. Rey JM, Walter G. *Hypericum perforatum* (St. John's wort) in depression: pest or blessing? Med J Austral 1998;169:583-6.
4. Weis RF, Fintelmann V. Ligų gydymas vaistingais augalais. (Use of the medicinal plants in therapy.) Vilnius; 1999. p. 212-3.
5. Vitiello B. *Hypericum perforatum* extracts as potential antidepressants. J Pharm Pharmacol 1999;51:513-7.
6. Mauri P, Pietta P. High performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry of *Hypericum perforatum* extracts. Rapid Commun Mass Spectr 2000;4:95-9.
7. Constantine GH, Karchesy J. Variations in hypericin concentrations in *Hypericum perforatum* L. and commercial products. Pharmaceut Biol 1998;36:365-7.
8. Büter B, Orlacchio C, Soldati A, Berger K. Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation of *Hypericum perforatum*. Planta Medica 1998;64:431-7.
9. Denke A, Schempp H, Mann E, et al. Biochemical activities of extracts from *Hypericum perforatum* L. (Arzneimittel – Forschung). Drug Research 1999;49:120-5.
10. Tumanova IV, editor. Gosudarstvennaja farmakopeja SSSR. (State pharmacopoeia.) Moskva; 1990. p. 323-5.
11. Hölzl J, Ostrowski E. Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) – HPLC – Analyse der wichtigen Inhaltsstoffe und deren Variabilität in einer Population. Deutsche Apotheker Zeitung 1987;127:1227-30.
12. Umek A, Kreft S, Kartnig T, Heydel B. Quantitative phytochemical analyses of six *Hypericum* species growing in Slovenia. Planta Medica 1999;65:388-90.
13. Belikov VV, Tochkova TV, Shatunova LV, et al. Kolichestvennoje opredelenije osnovnykh dejstvujushchikh veshchestv vidov *Hypericum* L. (Quantitative analysis of the main active substances in the *Hypericum* L.) Rastitel'nyje resursy 1990. p. 571-8.
14. Kartnig T, Heydel B, Lasser L, Debrunner N. Johanniskraut aus Schweizer Arzneipflanzenkultur. Agrarforschung 1997; 4:299-302.

Straipsnis gautas 2003 10 20, priimtas 2004 05 10
Received 20 October 2003, accepted 10 May 2004