

Kantaronun (*Hypericum perforatum L.*) Bileşimi ve Tıbbi Önemi

Yaşar HIŞIL*, Fahri ŞAHİN** , Serdar Bedii OMAI***

* Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği

** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı

*** Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı

ÖZET

Bu incelemede, kantaronun (*Hypericum perforatum L.*, Eng. St. John's Wort) analitik kompozisyonu, biyolojik olarak önemli olan bileşenleri ve onların kromatografik analizleri ve tıbbi yönden önemi hakkında yapılmış olan çalışmalar değerlendirilmiştir. Kantaronun etkinliği hakkında bir çok çalışma mevcuttur. Kantaron Avrupada pek çok patalog tarafından harici ve dahili olarak kullanılan geleneksel bir tıbbi bitkidir. Son yirmi yılda, bazı kantaron ekstraktlarının hafif ve orta şiddetteki depresyonun tedavisindeki etkinliği isbat edilmiş ve bu yüzden kantaron ekstraktları antidepresan olarak hem Avrupada ve hem de A.B.D. de kullanılmaktadır. Son yıllarda, kantaronun aktif bileşeni olan hiperisinin etkisini ortaya koyan çeşitli çalışmalar nedeniyle, potansiyel antikanserojen ajan olarak hiperisine ilgi artmıştır.

Anahtar Kelimeler : Kantaron, Hiperisin, Kanser tedavisi

ABSTRACT

Composition of *Hypericum perforatum L.* and Its Medical Importance

The analytical composition of the constituents with major biological interest of herbal drug St. John's Wort (*Hypericum perforatum L.*) and their chromatographical analyses and medical importance of extracts are studied in this review. There are many studies about efficacy of St. John's Wort. *Hypericum perforatum* is a medicinal plant traditionally used, both externally and internally, in all Europe for many pathologists. In the last two decades many studies have proved the efficacy of some St. John's Wort extracts in mild to moderate depression and it has been successful as an antidepresant both in Europe and the US. In recent years increased interest in hypericin which is active constituent of St. John's Wort, as a potential anticancer agent has arisen since several studies established its power.

Key Words: St. John's wort, Hypericin, Cancer treatment

GİRİŞ

Türkiyede yöresel olarak Binbirdelik otu, Kan otu, Kılıç otu, Mayasıl otu, Yara otu, Kuzu kıran ve ingilizcede St. John's wort adıyla bilinen *Hypericum perforatum* L., Hypericaceae familyasına dahil ve Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Amerika Birleşik Devletlerinde yetişen çok yıllık bir ottur. Geleneksel tıpta antidepresan tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır (1). Çeşitli Avrupa ülkelerinde fitoterapi sahasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Hypericum perforatum veya St. John bitkisi, 30-90 cm yüksekliğinde altın sarısı çiçeklere sahip çok yıllık bir bitkidir. Bugün *hypericum* ekstraktları hafif ve orta şiddetteki depresyon tedavisinde kullanılmaktadır. Günlük doz 1-2 mg hiperisin içeren 500 mg ekstrattır. Ağız yoluyla verilen bu dozda ki hiperisin, deri fototoksitesine yol açmaz. Çeşitli klinik çalışmalar göstermiştir ki, kantaron bilinen sentetik antidepresanlar kadar etkilidir. Hafif ve orta şiddetteki depresyon tedavisinde kantaron ekstraktlarının kullanımı üzerinde çeşitli yayımlar yapılmıştır (2-5). Kantaronun antidepresan etkisine içerdiği flavonoidlerin de önemli katkısının olduğu rapor edilmiştir (6).

KİMYASI

H. perforatum; chlorogenic asit, bir çok flavonoidler, naphthodianthrone'lar ve phloroglucinol'ler gibi biyolojik aktiviteye sahip birçok bileşikler içermektedir (8). Kantaron bazı alkollü içeceklerin (likör ve tonik gibi) hazırlanmasında aroma verici olarak da kullanılmaktadır. Avrupa Ekonomik Topluluğu (EEC)'nun 1988 yılındaki 88/388 sayılı direktifiyle, doğal aroma verici ekstraktların kullanılmasından dolayı hiperisin miktarının gıdalarda 0.1 ppm, kek ve tatlılarda 1 ppm ve alkollü içeceklerde 10 ppm'i aşmaması istenmiştir (7). Kantaron ekstraktlarının antidepresan (10,11) ve antiviral aktivitelerinin (12,13) görülmesinden sonra, hiperisin ve pseudohiperisinin mümkün olduğu kadar saf halde elde edilmesi için bu farmasötik potansiyelin araştırılması yapıldı. Stojanovic ve ark., *Hypericum* türlerinin n-alkanlar ve yağ asitlerini araştırmışlardır. n-alkanlar petrol eteriyle ekstrakte edilmiş, silikajel kolonda temizlenmiş ve İnce Tabaka Kromatografisiyle teşhis edilmişlerdir (14). *Hypericum* türlerinde Nonacosane (C₂₉H₆₀)

en yüksek (%68.8-88.6) oranda bulunan n-alkandır. Yağ asitleri arasında sırasıyla en yüksek oranda palmitik asit, oleik asit, lignoserik asit (24:0) ve erusik asit (22:1,cis-13) bulunmaktadır.

Kantaron herbal drug'ın bileşenleri ve yüzde oranları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Fuzzati ve ark., kantaronunda mevcut başlıca bileşenlerden hiperforinin parçalanma ürünlerini HPLC-MS ile araştırmışlardır (15). Hiperforin taze kantaron otunda %2-4 konsantrasyonda bulunur, antidepresan etkilidir ve ışığa ve havaya maruz kaldığında kararsızdır. Hiperisin piridin ve diğer organik bazlarda kırmızı renkli fluoresans özellikli çözelti verecek şekilde çözünür. Genellikle bir çok organik çözücüde çözünmez. Hiperisin alkali sulu çözücülerde çözünür; pH 11.5'un altında çözelti kırmızı, pH 11.5'un üzerinde ise yeşil renklidir (kırmızı fluoresanslıdır). Hiperforin yüksek oranda lipofilik, sıcaklığa duyarlı, fotodegradasyona hassas ve n-hegzan gibi apolar çözücülerde hızla parçalanmaktadır (16).

ANALİZİ

Hypericum perforatum preparasyonlarının *hypericum* ve *pseudohypericum* içerikleri Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC = High Pressure Liquid Chromatography) ile valide edilir. Analizde ya asidik fosfat veya nötral eluent sistemler(18) ve zıt-faz (RP-C18) kolonlar kullanılır.

Hiperisin ve/veya pseudohiperisinin çeşitli matrislerde kantitatif tayini için sınırlı sayıda yaygın mevcuttur. Libes ve ark., biyolojik sıvılarda hiperisinin tayini için bir HPLC metodu kullandılar. Bu metodda 590 nm'de kuvvetli absorbans ölçümü, uzun süreli dereceli elüsyon tekniği ve yavaş bir sıvı-ekstraksiyon usulü yer almaktaydı (18). Chi ve Franklin, plazmada hiperisin analizi için izokratik bir zıt-faz RP-HPLC metodunu kullandılar. Bu metodda fluorometrik dedeksiyon ve ön temizleme için katı-faz ekstraksiyon tüpleri (SPE) kullanıldı (19).

Farmasötik kapsüllerde hiperisin tayini için Draves ve Walker (20), HPLC metodlarını vermişlerdir. Vandenberg ve ark., hücre kültürlerinde hiperisine karşı psödohiperisinin fotositotoksik etkisini incelemişlerdir. Fluorometrik dedeksiyonlu, isokratik HPLC kullanmışlardır (17).

Tablo 1. Kantaron herbal drug'ın bileşenleri ve yüzde oranları(%). (Bilia ve ark.) (8)

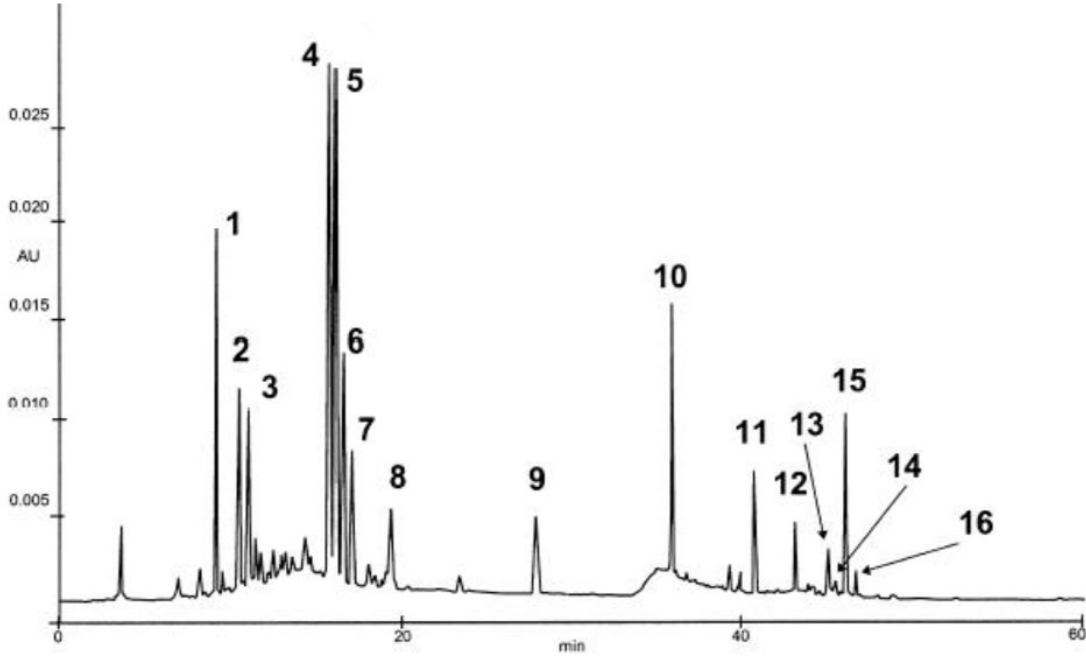
<i>Naphthodianthrone türevleri</i>	0.05-0.15
hypericin, pseudohypericin, protohypericin, protopseudohypericin	
<i>Flavonoller</i>	2.0-5.0
hyperoside (% 0.5-2.0)	
rutin (% 0.3-1.6)	
quercitrin (% 3.0)	
isoquercitrin (% 0.3)	
quercetin	
<i>Biflavonlar</i>	
biapigenin (yaklaşık % 0.26)	
amentoflavone	
<i>Phloroglucinol türevleri</i>	
hyperforin, adhyperforin ve bazı türevler (% 4 kadar)	
Xanthone'lar (10 ppm kadar)	
<i>Phenolic asitler</i>	
caffeic asit, chlorogenic asit, ferulic asit	
hyperfolin, p-cumaric asit, p-hydroxybenzoic asit, vanillic asit	
<i>Uçucu yağ</i>	0.05-1.0
esas olarak yüksek n-alkanlar	
<i>Steroller</i>	
β-sitosterol	
<i>Vitaminler</i>	
C vitamini, A vitamini	

Hypericum preparasyonlarına artan ilgi ve basit, hızlı, duyarlı ve ucuz analiz metodu talebi sebebiyle Zotou ve Loukou (20), isokratik zıt-faz HPLC metodunu sunmuşlardır. Kurutulmuş Yunan kantaron çiçek kısmında 7.00 ± 0.19 mg/g Hiperisin ve 6.41 ± 0.43 mg/g Pseudohiperisin bulunmuştur.

Brolis ve ark., *Hypericum perforatum*'un aktif bileşenlerinin HPLC ile tayinine ilişkin bir metod vermişlerdir. Zıt-faz C18 kolon ve 270 nm absorbans dedektör kullanılmıştır. Hareketli faz

olarak 3 lü dereceli elüsyon tekniği kullanılarak aktif bileşenler birbirlerinden başarılı bir şekilde ayrılmışlardır (9). Hareketli faz: A=Su-%85 fosforik asit (99.7:0.3), B=Asetonitril, C=Metanol. Sokslet cihazında metanol kullanılarak elde edilen *H. perforatum* ekstraktının profili Şekil 1'de görülmektedir. Benzer bir çalışma Li ve Fitzloff tarafından da yapılmıştır (21).

Yaşar Hışıl tarafından 1,1,1,2-Tetrafluoroethane kullanılarak elde edilen *Hypericum perforatum*



Şekil 1. *Hypericum perforatum* metanol ekstraktının HPLC kromatogramı (9)

- | | | |
|--------------------------------|---|-------------------------|
| 1. Chlorogenic asit izomeri, | 7. 3,3', 4', 5, 7-Pentahydroxyflavanone | 12. Hypericin, |
| 2. 3-O-p-Coumaroylquinic asit, | 7-O-Rhamnopyranoside, | 13. Hyperforin analogu, |
| 3. Chlorogenic asit, | 8. Quercitrin, | 14. Hyperforin analogu, |
| 4. Rutin, | 9. Quercetin, | 15. Hyperforin, |
| 5. Hyperoside, | 10. I3,II8 Biapigenin, | 16. Adhyperforin |
| 6. Isoquercitrin, | 11. Pseudohypericin, | |

ekstraktının GC/MS den alınan total iyon kromatogramı Şekil 2'de görülmektedir. Teşhis edilen bazı uçucu bileşikler de Tablo 2'de verilmiştir.

Schwob ve ark.'nın (23) yaptığı çalışmaya göre, güneydoğu Fransa'nın çeşitli yerlerinden temin edilen *H. perforatum* varyetelerinin esansiyel yağ verimi % 0.03-0.12 arasında değişmektedir.

ONKOLOJİ AÇISINDAN *HYPERICUM PERFORATUM* EKSTRAKTLARININ ÖNEMİ

Kanser hücre serilerinde farklı floresan organel işaretleyicileri ile yapılan hücresel lokalizasyon çalışmaları Hiperisinin endoplazmik retikulum ve golgi kompleksinde biriktiğini göstermiştir. Benzer şekilde Caco-2 kolon kanser hücrelerinde hem plazmada hem de çekirdek zarlarında birikim görülmüştür.

EMT-6 fare meme kanseri hücrelerinde mitokondrial fonksiyonları deprese ettiği, insan glioma hücreleri üzerinde de toksik etkisini mitokondrial

Tablo 2. *Hypericum perforatum* ekstraktının GC/MS total iyon kromatogramında belirlenen bazı uçucu bileşikler

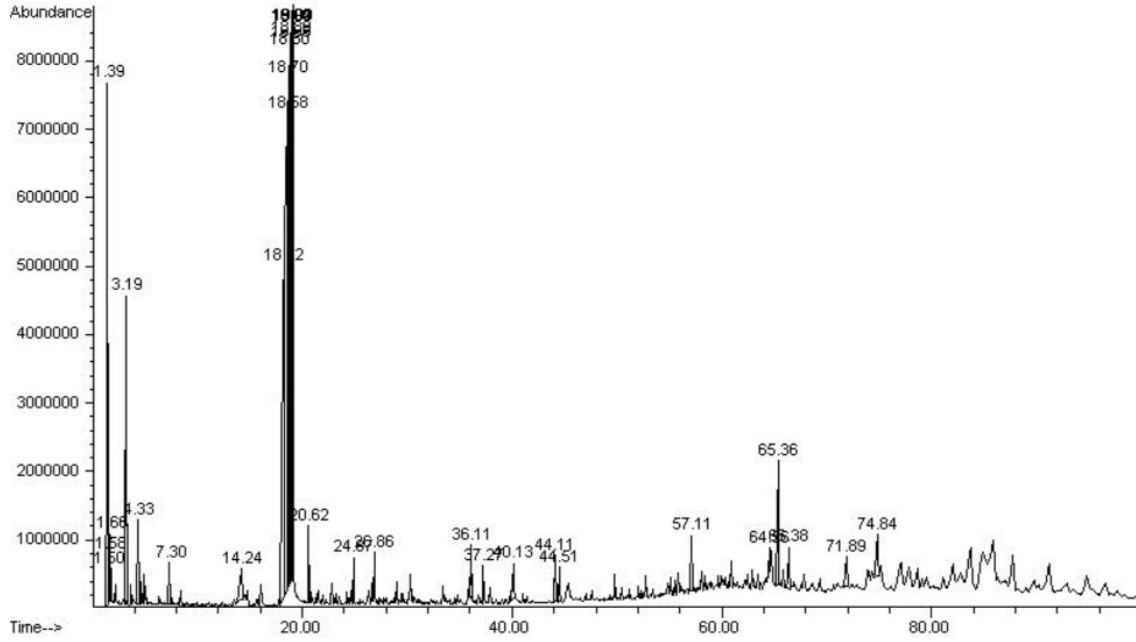
Alıkonma Zamanı (Dak.)	Bileşikler
1.39	1,1,1,2-tetrafluoroethane
1.66	2-Methyl-3-buten-2-ol
3.19	2,6-dimethylheptane
4.33	Alfa-Pinene
4.95	3-Methylnonane
7.30	2-Methyldecane
18.22-19.10	Triacetin (Ekstrakt GC/MS analizi için triacetin'de çözülmüştür.)
20.62	Beta-caryophyllene
24.87	Eugenyl acetate
26.86	Caryophyllene oxide
36.11	6,10,14-Trimethyl-2-Pentadecanone
37.27	7-Hexadecene
40.13	Hexadecanoic acid (Palmitic acid)
44.11	n-Heneicosane
44.51	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol

fonksiyonları bozarak gösterdiği ortaya konmuştur. Bu çalışmalar Hiperisin'in fototoksitesinin mitokondrial enerji mekanizmaları üzerinden olduğu kanaatini oluşturmuştur. AY-27 sıçan mesane karsinoma hücrelerinde sitotoksitesini apoptozis (programlı hücre ölümü) ile gösterirken HL-60 insan lösemi hücrelerinde apoptozisten nekroze kadar değişen bir spektrumda etkisi görülmüştür.

Yine insan servikal karsinoma HeLa ve fare T hücre hibridoma serilerinde mitokondrial sitokrom C'nin sitozole salınmasını uyararak apoptozis ile sitotoksitesite oluşturduğu gözlenmiştir. Jurkat lenf kanseri hücrelerinde ise daha çok trail reseptörü üzerinden apoptotik mekanizmalar aktive olduğu tespit edilmiştir (24).

Grubumuzun yaptığı ekstrakt çalışmalarında HL-60 lösemik hücrelerinde belirgin sitotoksitesite kendini göstermiştir (yayınlanmamış veriler). Kemir-

genlerdeki *in-vivo* tümör çalışmalarında *Hypericum* ekstraktları ve Hiperisin ile umut verici veriler elde edilmiştir. Hopfner ve ark. özofagus adenokarsinoma hücre serilerinde Hypericin ile fotodinamik tedavinin etkinliğini belirtmişlerdir (25). Bruggisser ve ark. MCF-7 insan meme kanser hücre serilerinde kantaron ekstraktı ile toksik veriler elde etmişlerdir (26). Hostanska ve ark. ise K-562 ve U-937 lösemi ve LN-229 glioblastoma hücrelerinde toksik etkilerini rapor etmişlerdir (27). Kronik inflamatuvar hastalıklardaki etkinlikteki mekanizmanın İNOS-NO yolağı üzerinden olduğu Tedeschi ve ark tarafından iddia edilmiştir (28). Yine insan megakaryoblastik lösemi hücre serisinde Shiono ve ark. protein kinaz C yolağı üzerinden sitotoksitesite belirlemişlerdir (29). Kim ve ark. U-937 insan histiyositik lenfoma hücrelerinde hiperisin'in diferansiyasyon-apoptozis etkinliğini bulmuşlardır (30). Bir diğer çalışmada ise insan over karsinoma



Şekil 2. *Hypericum perforatum* ekstraktının GC/MS total iyon kromatogramı

hücrelerinde hiperisinin tirozin kinaz-MEG/ERG yolağını aktive ederek etkin olduğu ortaya konmuştur (31).

Bu çalışmalar toplu olarak değerlendirildiğinde kendi verilerimizi de katarak sarı kantaron ekstraktları ve içeriğinde yoğun olarak bulunan hiperisinin geniş anti-tümöral etkinlik gösterdiği ortaya çıkmaktadır. Bu sitotoksik etkinlik temel olarak diferansiyasyon-apoptozis üzerinden oluşmaktadır. Hayvan tümör modelleri üzerindeki daha ileri çalışmalar, bu ekstrakt ve içeriğindeki anti-tümöral moleküllerin anti-kanser ilaç geliştirilmesi için yolunu daha da açacaktır.

KAYNAKLAR

1. Merck Index, 2003. 13th Edition. Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ.
2. Linde K, Ramirez G, Mulrow CD, Pauls A, Weidenhammer W, Melchart D. St John's wort for depression--an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *BMJ* 3;313:253-8, 1996.
3. Volz HP. Controlled clinical trials of hypericum extracts in depressed patients--an overview. *Pharmacopsychiatry*. 30 Suppl 2:72-6, 1997.
4. Gaster B, Holroyd J. St John's wort for depression: a systematic review. *Arch Intern Med*. 24;160(2):152-6, 2000.
5. Bombardelli E, Morazzoni P. *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*, 66,1: 43-68, 1995.
6. Butterweck V, Jurgenliemk G, Nahrstedt A, Winterhoff H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med* 66(1):3-6, 2000.
7. L184 of July 15,1988, in Official Journal of the European Communities, p.61 (EEC Council Directive 88/388 of June 22, 1988).
8. Bilia AR, Gallori S, Vincieri FF. St. John's Wort and depression--efficiency, safety and tolerability. *Life Sciences* 70: 3077-3096, 2002.
9. Brolis M, Gabetta B, Fuzzari N, Pace R, Panzeri F, Peterlongo F. Identification by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography-UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *J Chromatogr A* 825:9-16,1998. (with permission from Elsevier).
10. Harrer G, Schulz V. Clinical investigation of the antidepressant effectiveness of hypericum. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 1:S6-8, 1994.

- 11 Vorbach EU, Hubner WD, Arnoldt KH. Effectiveness and tolerance of the hypericum extract LI 160 in comparison with imipramine: randomized double-blind study with 135 outpatients. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 1: S19-23, 1994.
- 12 Hudson JB, Lopez-Bazzocchi I, Towers GH. Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Res* 15(2):101-12, 1991.
- 13 Tang J, Colacino JM, Larsen SH, Spitzer W. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. *Antiviral Res* 13(6):313-25, 1990.
- 14 Stojanovic G, Palic R, Tarr CH, Reddy CM, Marinkovic O. n-alkanes and fatty acids of *Hypericum perforatum*, *Hypericum maculatum* and *Hypericum olympicum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31, 223-226, 2003.
- 15 Cui Y, Gurley B, Ang CYW, Leakey J. Determination of hyperforin in human plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B* 780:129-135, 2002.
- 16 Vandenberghe AL, Kamuhabwa A, Delay E, Himpens BE, Merlevede WJ, De Witte PA. Photocytotoxic effect of pseudohypericin versus hypericin. *J Photochem Photobiol B Biol* 45: 87-94, 1998.
- 17 Liebes L, Mazur Y, Freeman D, Lavie D, Lavie G, Kudler N, et al. A method for the quantitation of hypericin, an antiviral agent, in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 15;195(1):77-85, 1991.
- 18 Chi JD, Franklin M. Determination of hypericin in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 5;724(1):195-8, 1999.
- 19 Draves AH, Walker SE. Determination of hypericin and pseudohypericin in pharmaceutical preparations by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 10;749(1):57-66, 2000.
- 20 Zotou A, Loukou Z. Determination of Hypericin and Pseudohypericin in Extracts from *Hypericum perforatum* L. and Pharmaceutical Preparations by Liquid Chromatography - Fluorescence Detection. *Chromatographia* 54:218-224, 2001.
- 21 Li W, Fitzloff JF. High performance liquid chromatographic analysis of St. John's Wort with photodiode array detection. *J Chromatogr B* 765:99-105, 2001. (with permission from Elsevier).
- 22 Schwob I, Bessiere JM, Viano J. Composition of the essential oils of *Hypericum perforatum* L. from southeastern France. *C R Biologies* 325, 781-785, 2002.
- 23 Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PA. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol* 34(3):221-41, 2002.
- 24 Hopfner M, Maaser K, Theiss A, Lenz M, Sutter AP, Kashtan H, et al. Hypericin activated by an incoherent light source has photodynamic effects on esophageal cancer cells. *Int J Colorectal Dis* 18(3):239-47, 2003.
- 25 Bruggisser R, von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med* 68(5):445-8, 2002.
- 26 Hostanska K, Reichling J, Bommer S, Weber M, Saller R. Hyperforin a constituent of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. *Eur J Pharm Biopharm* 56(1):121-32, 2003.
- 27 Tedeschi E, Menegazzi M, Margotto D, Suzuki H, Forstermann U, Kleinert H. Anti-inflammatory actions of St. John's wort: inhibition of human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1 alpha (STAT-1alpha) activation. *J Pharmacol Exp Ther* 307(1):254-61, 2003.
- 28 Shiono Y, Shiono N, Seo S, Oka S, Yamazaki Y. Effects of polyphenolic anthrone derivatives, resistomycin and hypericin, on apoptosis in human megakaryoblastic leukemia CMK-7 cell line. *Z Naturforsch [C]*. 57(9-10):923-9, 2002.
- 29 Kim JI, Park JH, Park HJ, Choi SK, Lee KT. Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by hypericin. *Arch Pharm Res* 21(1):41-5, 1998.
- 30 Hwang MS, Yum YN, Joo JH, Kim S, Lee KK, Gee SW, et al. Inhibition of c-erbB-2 expression an activity in human ovarian carcinoma cells by hypericin. *Anticancer Res* 21:2649-55, 2001.

Yazışma Adresi:

Prof. Dr. Yaşar HIŞİL
Ege Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü
Bornova
İZMİR
e-mail: yasar.hisil@ege.edu.tr