



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος

Πτυχιακή διατριβή:

«Επίδραση του χρόνου συντήρησης των ανθέων *Hypericum perforatum* στην περιεκτικότητα εκχυλισμάτων μεθανόλης και ελαιολάδου σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη»



Αθηνά Σπυρίδη

Επιβλέπων Καθηγητής: Χρήστος Λύκας

Βόλος, 2018

**«Επίδραση του χρόνου συντήρησης των ανθέων *Hypericum perforatum*
στην περιεκτικότητα εκχυλισμάτων μεθανόλης και ελαιόλαδου σε
υπερικήνη και ψευδοϋπερικήνη»**

Πτυχιακή Διατριβή Αθηνάς Σπυρίδη

Τριμελής Επιτροπή

Χρήστος Λύκας (Επιβλέπων), Επίκουρος Καθηγητής, Ανθοκομία και Αρχιτεκτονική Τοπίου, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

Νικόλαος Τσιρόπουλος (Μέλος), Καθηγητής, Αναλυτική Χημεία και Γεωργική Φαρμακολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

Ανέστης Καρκάνης (Μέλος), Επίκουρος Καθηγητής, Ζιζανιολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Λύκα Χρήστο για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με αυτό το θέμα, καθώς και για όλη τη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας πτυχιακής εργασίας, και τον καθηγητή κ. Τσιρόπουλο Νικόλαο για την πολύτιμη βοήθεια που μου έδωσε κατά την λήψη και ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Επιπρόσθετα, ευχαριστώ τους φίλους μου για όλη την φυσική και ψυχολογική βοήθεια που μου προσέφεραν και για τις κοινές προσπάθειες που κάναμε μαζί όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου που μου στάθηκε με κάθε τρόπο, προσφέροντάς μου την αμέριστη στήριξη της σε όλα τα επίπεδα, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Το *Hypericum perforatum* είναι ένα βότανο γνωστό σε παγκόσμιο επίπεδο για την πληθώρα θεραπευτικών και επουλωτικών ιδιοτήτων που το χαρακτηρίζουν. Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στις ουσίες υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη που περιέχονται σε αυτό. Για την αξιοποίηση των φαρμακευτικών ιδιοτήτων του φυτού, παρασκευάζονται από τη βιομηχανία εκχυλίσματά του σε αλκοόλες (βάμματα) καθώς και εκχυλίσματά του σε λάδι. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι η ανθοφορία του φυτού και κατ' επέκταση η δυνατότητα χρησιμοποίησής του είναι περιορισμένη σε ένα μικρό χρονικό διάστημα των καλοκαιρινών μηνών. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η επίδραση των συνθηκών κατάψυξης στην περιεκτικότητα της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης, ώστε να τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, να μπορεί να γίνει χρήση του φυτού καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Η παρούσα εργασία αποτελεί συνέχεια προηγούμενης έρευνας που αφορούσε τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης φρέσκων ανθέων υπέρικου, σε εκχυλίσματα ελαιόλαδου και μεθανολικά βάμματα. Κατά την παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου και των συνθηκών συντήρησης των φρέσκων ανθέων του υπέρικου στην περιεκτικότητα των δύο αυτών ουσιών. Συγκεκριμένα, τα φρέσκα άνθη τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη για ορισμένο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια παρασκευάστηκαν εκ νέου μεθανολικά βάμματα και εκχυλίσματα σε λάδι από το κατεψυγμένο φυτό. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική μείωση στην περιεκτικότητα της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές που λήφθηκαν από τα εκχυλίσματα φρέσκου υπέρικου, τόσο στα μεθανολικά βάμματα όσο και στα εκχυλίσματα ελαιόλαδου, χωρίς όμως να επηρεάζονται τα αποτελέσματα από τη μέθοδο εκτίμησης της περιεκτικότητας των ουσιών που χρησιμοποιήθηκε. Ωστόσο, αφενός η μείωση αυτή ήταν αναμενόμενη σε ένα βαθμό λόγω της ευαισθησίας που χαρακτηρίζει αυτές τις ουσίες, αφετέρου, οι τιμές των συγκεντρώσεων της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης δεν ξεπερνούσαν το κατώτερο όριο (0,08%) που προτείνεται από τη διεθνή βιβλιογραφία ώστε τα σκευάσματα που έχουν ως βάση το υπέρικο, να έχουν φαρμακευτική δράση. Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό, καθώς επιτρέπει ως επακόλουθο την χρήση της κατάψυξης ως μέσο συντήρησης του φρέσκου φυτού, με σκοπό τη χρήση του κατά της περιόδους που δεν βρίσκεται σε ανθοφορία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Βοτανική περιγραφή	1
1.2 Καταγωγή.....	3
1.3 Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις	3
1.4 Πολλαπλασιασμός και εποχή εγκατάστασης της καλλιέργειας.....	4
1.5 Ετυμολογία – Ιστορικές αναφορές.....	4
1.6 Χρήσεις στην ιατρική	6
1.6.1. Κατάθλιψη.....	6
1.6.2. Αντιβακτηριδιακές και αντϊικές ιδιότητες.....	6
1.6.3. Αντικαρκινικές ιδιότητες	7
1.6.4. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες	7
1.6.5. Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες	8
1.6.6. Επουλωτικές ιδιότητες	8
1.6.7.Προεμμηνοροϊκό σύνδρομο	8
1.7 Συστατικά- Χημική σύσταση.....	8
1.8 Υπερικήνη και ψευδοϋπερικήνη	9
1.9 Υπερφορίνη και Αντι-υπερφορίνη.....	10
1.10 Παρασκευή βαλσαμέλαιου - Χρήσεις.....	12
1.11 Παρασκευή βάμματος υπέρικου – Χρήσεις	13
1.12 Επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στην περιεκτικότητα των δραστικών ουσιών στο υπέρικο.	14
2. Σκοπός της εργασίας.....	15
3. Υλικά και μέθοδοι	16
3.1. Φυτικό Υλικό	16
3.2. Εκχύλιση σε μεθανόλη	16

3.3. Εκχύλιση σε ελαιόλαδο	18
3.4. Υπολογισμός της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης	20
3.4.1. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	20
3.4.2. Φασματοφωτομετρία.....	22
4. Αποτελέσματα.....	24
4.1 Περιεκτικότητα υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης στα εκχυλίσματα μεθανόλης (βάρματα) κατεψυγμένου φυτικού ιστού (HPLC).....	24
4.2 Περιεκτικότητα αθροίσματος υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης στα εκχυλίσματα μεθανόλης (βάρματα) κατεψυγμένου φυτικού ιστού (UV-VIS).	26
4.3 Περιεκτικότητα αθροίσματος υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης κατεψυγμένου φυτικού ιστού στα εκχυλίσματα μεθανόλης (βάρματα) μετρημένα με HPLC και UV-VIS.	27
4.4 Περιεκτικότητα αθροίσματος υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης κατεψυγμένου φυτικού ιστού στα εκχυλίσματα ελαιόλαδου (HPLC).....	28
5. Συζήτηση	29
5.1 Επίδραση κατάψυξης στην περιεκτικότητα της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης.....	29
5.2 Επίδραση μέσου εκχύλισης στην περιεκτικότητα της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης.....	30
5.3 Επίδραση των μεθόδων προσδιορισμού στον υπολογισμό της περιεκτικότητας της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης.....	30
6. Συμπεράσματα	32
7. Βιβλιογραφία	33

1. Εισαγωγή

1.1 Βοτανική περιγραφή

Το Υπέρικο ανήκει στην οικογένεια Hypericaceae (Πίνακας 1.1). Είναι γνωστό με διάφορες κοινές ονομασίες όπως βάλσαμο, βαλσαμόχορτο, βότανο του Αγίου Ιωάννη, σπαθόχορτο, λειχηνόχορτο, χελωνόχορτο κ.α. Είναι πολυετής θάμνος με διάρκεια ζωής 6- 7 έτη, ύψους 20- 80 cm. Ο βλαστός του είναι όρθιος, κυλινδρικός που διατρέχεται κατά μήκος από δύο αντίθετα τοποθετημένες έντονες γραμμές. Διαθέτει φύλλα μικρά, επιμήκη, ωοειδή, μήκους 3-5 cm., που είναι αντίθετα διατεταγμένα και άμισχα. Κατά την έκθεση των φύλλων στο φως διακρίνονται εκκριματοφόρα κύτταρα που περιέχουν την ουσία υπερικίνη (Εικόνα 1.1).

Πίνακας 1.1 Συστηματική ταξινόμηση

Βασίλειο	Φυτά (Plantae)
Συνομοταξία	Αγγειόσπερμα (Angiospermae)
Τάξη	Theales
Οικογένεια	Hypericaceae
Γένος	Hypericum
Είδος	<i>Hypericum perforatum</i>

Τα άνθη του είναι κιτρινόχρυσου έως πορτοκαλόχρου χρώματος με μαύρα στίγματα, έχουν πέντε λογχοειδή πέταλα και σχηματίζουν ταξιανθίες φόβης (Εικόνα 1.2). Τα σέπαλα είναι μυτερά με διάσπαρτα μαύρα στίγματα. Διαθέτουν πολυάριθμους στήμονες και έναν ύπερο. Η άνθιση αρχίζει τον Ιούνιο και διαρκεί έως και δύο μήνες. Ο καρπός, που εμφανίζεται στο τέλος του καλοκαιριού, είναι κάψα και περιέχει αρκετούς μαύρου ή σκούρου καφέ χρώματος σπόρους.



Εικόνα 1.1 Φύλλο *Hypericum perforatum*.



Εικόνα 1.2 Άνθος *Hypericum Perforatum*.

1.2 Καταγωγή

Το Υπέρικο συναντάται από τον Ισημερινό έως τα μέσα γεωγραφικά πλάτη όλων των ηπείρων, σε μεγαλύτερο όμως βαθμό στο βόρειο ημισφαίριο, τόσο σε πεδινές όσο και σε ορεινές τοποθεσίες. Η καταγωγή του είναι από την Ευρώπη, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχει εξαπλωθεί σε Ασία, Αυστραλία, Αφρική και Αμερική. Στη χώρα μας συναντάται ως αυτοφυές φυτό σε μεγάλο βαθμό καθώς ευνοείται από τις εδαφοκλιματικές συνθήκες του τόπου. Το βάλαμο, αναφέρεται ως επιβλαβές ζιζάνιο σε ορισμένες περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών εξαιτίας της φωτοτοξικότητας που φέρεται να προκαλεί στα ζώα μετά από κατανάλωσή του. Σε μεγάλες δόσεις προκαλεί δηλητηρίαση στα ζώα βοσκής, με συμπτώματα ερεθισμού του δέρματος και έντονης ανησυχίας. Για το λόγο αυτό ακολουθούνται προγράμματα καταπολέμησής του με ζιζανιοκτόνα.

1.3 Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις

Ως αυτοφυές φυτό, προτιμά ηλιόλουστες θέσεις και εδάφη που σχηματίστηκαν από ασβεστολιθικά πετρώματα. Αναπτύσσεται σε pH εδάφους έως 8, ενώ αποδίδει καλά και σε ελαφρώς όξινα εδάφη με pH έως 6, αρκεί να έχουν καλή αποστράγγιση. Δύναται να αναπτυχθεί σε υψόμετρο έως και 2.500 m από το επίπεδο της θάλασσας. Φύεται σε εδάφη φτωχά έως μέτριας γονιμότητας και ως επί το πλείστον ξηρικά, ωστόσο η καλλιέργεια μπορεί να βοηθηθεί με μερικά ποτίσματα στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυτών. Είναι φυτό που αντέχει στους παγετούς.

1.4 Πολλαπλασιασμός και εποχή εγκατάστασης της καλλιέργειας

Ο πολλαπλασιασμός του βαλσαμόχορτου γίνεται κυρίως με σπόρο, εν τούτοις μπορεί να γίνει και με μοσχεύματα και παραφυάδες.

Ο σπόρος σπέρνεται στο θερμοκήπιο από 15 Ιανουαρίου έως το πολύ, αρχές Φεβρουαρίου με σκοπό την απόκτηση γυμνόρριζων σποροφύτων, τα οποία στη συνέχεια μεταφυτεύονται. Για κάθε τ.μ. σπορείου απαιτούνται 2 g σπόρων (8000 σπόροι/γραμμάριο). Οι σπόροι δεν καλύπτονται μετά τη σπορά καθώς χρειάζονται φως για το φύτρωμα. Για το λόγο αυτό οι σπόροι πρέπει να ποτίζονται καθημερινά με λίγο νερό έως ότου φυτρώσουν, 7- 10 ημέρες μετά τη σπορά. Η μεταφύτευση πραγματοποιείται 10- 12 εβδομάδες μετά τη σπορά.

Ο πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα είναι ένας εύκολος τρόπος πολλαπλασιασμού. Τα μοσχεύματα μπορούν να ληφθούν δύο φορές το χρόνο, τον Οκτώβριο ή τον Μάρτιο. Τέλος ο πολλαπλασιασμός με παραφυάδες, πραγματοποιείται με τον τεμαχισμό της ρίζας σε μήκη που ποικίλουν μεταξύ 5- 15 cm και διαμέτρου 0,6- 1,2 cm. Στη συνέχεια, οι παραφυάδες τοποθετούνται σε αβαθή αυλάκια στο έδαφος και καλύπτονται με μια λεπτή στρώση χώματος. Ωστόσο η μέθοδος αυτή δημιουργεί περιορισμένο αριθμό φυτών και για το λόγο αυτό δεν χρησιμοποιείται σε εντατικές καλλιέργειες.

1.5 Ετυμολογία – Ιστορικές αναφορές

Η ονομασία του φυτού Υπέρικον (*Hypericum perforatum*) προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «υπέρ» (άνωθεν) και «εικών» (εικόνα). Η λατινική ονομασία του φυτού «διάτρητον» (*perforatum*) έχει να κάνει με το γεγονός ότι τα φύλλα του, που διαθέτουν στίγματα, όταν εκτεθούν στο φως δίνουν την εντύπωση «διάτρητης» εμφάνισης. Σύμφωνα με μια μεσαιωνική εκδοχή, η τοποθέτηση του φυτού πάνω στις θρησκευτικές εικόνες του σπιτιού στις 24 Ιουνίου, ανήμερα της γιορτής του Αγίου Ιωάννη, ξόρκιζε το κακό. Ήδη, από τις παγανιστικές γιορτές του θερινού ηλιοστασίου, το μόλις φρεσκοανθισμένο υπέρικο εθεωρείτο μαγικό φυτό. Επίσης, στην Αγγλοσαξονική παράδοση, υπήρχε η πεποίθηση ότι το υπέρικο είχε τη δύναμη να διώχνει τους δαίμονες και να απομακρύνει τους διαβολικούς πειρασμούς.

Ακόμη, το φυτό υπέρικο ήταν άμεσα συνυφασμένο και με τον Χριστιανισμό. Οι Χριστιανοί συνήθιζαν να κρεμούν έναν σταυρό μαζί με το βάλαμο στις πόρτες για να προστατεύουν τα σπίτια τους από το κακό. Επιπλέον οι θεραπευτικές ιδιότητες του βάλαμου συνδέθηκαν με τη ζωή του Αγίου Ιωάννη του Προδρόμου, εξ ου και μία από τις ονομασίες του φυτού «βότανο του Αϊ Γιάννη». Η ανθοφορία του βάλαμου αρχίζει από τα τέλη Ιουνίου, κοντά στη γενέθλια γιορτή του Αγίου Ιωάννη του Προδρόμου, στις 24 Ιουνίου. Κατά τη λαϊκή παράδοση, στις 29 Αυγούστου, ημέρα του αποκεφαλισμού του Αγίου Ιωάννη, εμφανίζονται στα φύλλα του φυτού κόκκινα στίγματα που μοιάζουν με σταγόνες αίματος. Μια άλλη παράδοση από την εποχή του Μεσαίωνα, αναφέρει ότι το φυτό φύτρωσε από το αίμα του Αγίου Ιωάννη στο σημείο όπου αυτός αποκεφαλίστηκε.

Το βάλαμο, θεωρείται ένα αξιόλογο φαρμακευτικό φυτό για πάνω από 2000 χρόνια. Κατά την αρχαιότητα, ο Γαληνός, ο Πλίνιος, ο Διοσκουρίδης και ο Ιπποκράτης, το συνιστούσαν ως διουρητικό, επουλωτικό πληγών, αποχρεμπτικό, εμμηναγωγό και αιμοστατικό. Επίσης εθεωρείτο ότι είχε ανθελμινθική δράση και θεράπευε τα δαγκώματα φιδιών. Στο μεσαίωνα, οι βοτανολόγοι Παράκελσος και Gerard το συνιστούσαν για τη θεραπεία της κατάθλιψης και της μελαγχολίας. Στης εποχή των σταυροφοριών οι βαθιές πληγές που προέρχονταν από σπαθιά, επουλώνονταν με κομπρέσες υπέρικου. Τα μετέπειτα χρόνια η χρήση του ως αφέψημα ή βάμμα ήταν ευρεία για την καταπολέμηση του άγχους, της κατάθλιψης, της αϋπνίας, της γαστρίτιδας καθώς και της κατακράτησης υγρών. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε για την θεραπεία πληγών (ειδικά των βαθιών που προξενούσαν καταστροφή των νεύρων), εκδορών, κοψιμάτων και εγκαυμάτων.

1.6 Χρήσεις στην ιατρική

1.6.1. Κατάθλιψη

Σήμερα, το υπέρικο χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό για την καταπολέμηση της κατάθλιψης και των διαταραχών διάθεσης. Διατίθεται στο εμπόριο με ποικίλα σκευάσματα, όπως ταμπλέτες, κάψουλες, τσάι και βάμματα. Επιπλέον διατίθεται με τη μορφή εκχυλίσματος σε λάδι και με τη μορφή αλοιφών. Η λαμβανόμενη δόση, όπως προκύπτει από διάφορες κλινικές δοκιμές είναι 300-1800 mg εκχυλίσματος/ ημέρα (Barnes, Anderson and Phillipson 2001). Ένα παράδειγμα τυποποιημένου εκχυλίσματος αποτελεί το STEI 300, το οποίο περιέχει 0,2-0,3% υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη και διατίθεται σε κάψουλες των 350 mg εκχυλίσματος (Phillipp, Kohnen, and Hiller 1999).

Οι διαταραχές διάθεσης έχουν συμπτώματα όπως έντονα συναισθήματα θλίψης, ενοχές, απώλεια ή υπερβολική αύξηση της όρεξης, ακανόνιστο ύπνο, μειωμένη ενέργεια, μείωση ικανότητας συγκέντρωσης και απώλεια ενδιαφέροντος, με πιο σοβαρά συμπτώματα αυτά των αυτοκτονικών τάσεων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα όλο και περισσότερα άτομα να απευθύνονται σε ειδικούς με αποτέλεσμα τη λήψη φαρμακευτικής αγωγής.

Σε κλινικές έρευνες που πραγματοποιήθηκαν προέκυψε ότι η υπερικίνη αποτελεί αντικαταθλιπτικό παράγοντα του υπέρικου λόγω της διέγερσης που προκαλεί στην τριχοειδή ροή του αίματος (DerMarderosian and Beutler 2002). Έχει αποδειχθεί ότι έχει μια ισχυρή συνάφεια με τους υποδοχείς σίγμα, οι οποίοι ρυθμίζουν τα επίπεδα ντοπαμίνης.

Παρότι όμως η υπερικίνη έχει αποδειχθεί ότι έχει αντικαταθλιπτικές ιδιότητες, δεν μπορεί να θεωρηθεί ως η μοναδική ουσία που προσδίδει στο υπέρικο αντικαταθλιπτική δράση. Από έρευνες έχει προκύψει ότι η υπερφορίνη αποτελεί επίσης έναν ισχυρό αντικαταθλιπτικό παράγοντα και η δράση της συνίσταται στην αναστολή επαναπρόσληψης σερετονίνης, ντοπαμίνης, GABA και L-γλουταμινικού άλατος από τη συναπτική σχισμή (Müller, Singer, and Wonnemann 2001).

1.6.2. Αντιβακτηριακές και αντίϊκές ιδιότητες

Στο υπέρικο έχουν αποδοθεί θεραπευτικές ιδιότητες όσον αφορά στην επούλωση πληγών, στη μείωση των φλεγμονών εξαιτίας των αντιβακτηριδιακών

ιδιοτήτων που έχει, καθώς και ως αντίική προστασία. Χάρη σε αυτές τις ιδιότητες χρησιμοποιείται ευρέως για την αντιμετώπιση κοψιμάτων, εκδορών και άλλων τραυμάτων. Οι αντιβακτηριδιακές ιδιότητες του υπέρικου οφείλονται κυρίως στην ουσία υπερφορίνη. Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι η υπερφορίνη αναστέλλει την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών. Παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης όλων των θετικών κατά Gram βακτηριδίων που εξετάστηκαν, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης των αρνητικών κατά gram βακτηριδίων (Saddiqe et al. 2010).

Η θεραπευτική δράση της υπερίκινης επεκτείνεται και στην αναστολή του ιού του έρπητα (Tang et al., 1990). Παράλληλα το υπέρικο χρησιμοποιείται για την θεραπεία ασθενών με σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS) (Lavie 1995).

1.6.3. Αντικαρκινικές ιδιότητες

Σύμφωνα με τους Stemprr et al. (2002), η υπερφορίνη αναστέλλει την ανάπτυξη καρκινικών όγκων *in vitro*. Από την άλλη πλευρά η υπερίκινη αναφέρθηκε από τους Fox et al. (1998) ότι αναστέλλει την ανάπτυξη κυττάρων προερχόμενων από διάφορους νεοπλαστικούς ιστούς όπως μελάνωμα, νευροβλάστωμα, αδένωμα, καρκίνωμα, σάρκωμα και λευχαιμία.

Οι Hostanska et al. (2003) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η υπερφορίνη και η υπερίκινη συνεργάζονται στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των λευχαιμικών κυττάρων.

1.6.4. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Το εκχύλισμα του υπέρικου φαίνεται να μειώνει το οξειδωτικό στρες και κατά συνέπεια να εμποδίζει τις φλεγμονές και τα γαστρεντερικά προβλήματα. Επιπλέον το εκχύλισμα του υπέρικου στην τυποποιημένη του μορφή μπορεί να αποτρέψει την συρρίκνωση των κυττάρων του DNA που προκαλείται από την δραστηριότητα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Zou et al. 2004). Ως αποτέλεσμα, μπορεί να θεραπεύσει αποτελεσματικά τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες όπως οι νόσοι του Parkinson και του Alzheimer (Zou et al. 2010).

1.6.5. Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες

Η κερκετίνη, που είναι το κύριο εκχύλισμα ελαίου του υπέρικου, αποδείχτηκε ότι έχει αντιφλεγμονώδεις και γαστροπροστατευτικές ιδιότητες.

1.6.6. Επουλωτικές ιδιότητες

Η χρήση του υπέρικου ως επουλωτικό πληγών γίνεται σε ευρεία κλίμακα εδώ και χιλιάδες χρόνια. Η δράση του συνίσταται στην αυξημένη παραγωγή κολλαγόνου ακολουθούμενη από την ενεργοποίηση κυττάρων υπεύθυνων για το κλείσιμο του τραύματος.

1.6.7. Προεμμηνορροϊκό σύνδρομο

Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, η καθημερινή λήψη υπέρικου οδηγεί στην εξομάλυνση των φυσικών και ψυχολογικών συμπτωμάτων που σχετίζονται με το προεμμηνορροϊκό σύνδρομο.

1.7 Συστατικά- Χημική σύσταση

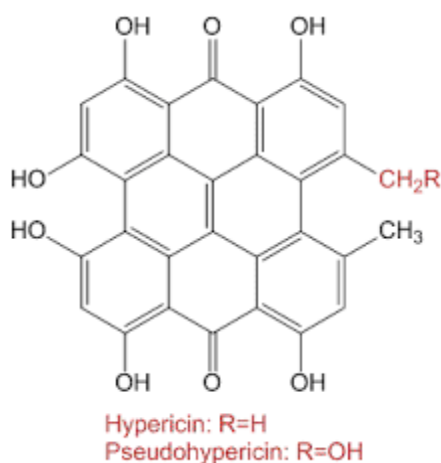
Το υπέρικο περιέχει πλήθος ωφέλιμων ουσιών ορισμένες από τις οποίες είναι τα **φλαβονοειδή** (ρουτίνη, κερκετίνη, υπεροζίτη, κερσιτρίνη, ισοκερσιτρίνη), **φαινολικές ενώσεις** (καφεϊκό οξύ, κουμαρικό οξύ, χλωρογενικό οξύ), **ναφθοδιανθρόλες** (υπερικήνη, ψευδοϋπερικήνη, πρωτοϋπερικήνη και πρωτοψευδοϋπερικήνη), **φλορογλουκινόλες** (υπερφορίνη, αντι-υπερφορίνη) καθώς και **τανίνες**, **αιθέρια έλαια** (μονοτερπένια, αλκοόλες), **πηκτίνη**, **αμινοξέα** (GABA) και **βιταμίνες** (καροτινοειδή, χολίνη). Οι ναφθοδιανθρόλες υπερικήνη και ψευδοϋπερικήνη, όπως και η φλορογλουκινόλη υπερφορίνη θεωρούνται μερικά από τα κύρια δραστικά συστατικά που καθιστούν το φυτό αυτό θεραπευτικό διάφορων ασθενειών.

1.8 Υπεरिकίνη και ψευδοϋπεरिकίνη

Η υπεरिकίνη όπως και η ψευδοϋπεरिकίνη είναι δύο χημικές ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των ναφθοδιανθρολών και αποτελούν τις κύριες κόκκινες χρωστικές που εμπεριέχονται στο Υπέρικο (Εικόνα 1.3). Η περιεκτικότητα της ψευδοϋπερικίνης στο υπέρικο είναι 2-4 φορές υψηλότερη από αυτή της υπερικίνης (Karioti et al. 2010)

Ευθύνονται για το κόκκινο χρώμα που έχουν τα εκχυλίσματα υπέρικου και ανιχνεύονται στα σέπαλα, στα πέταλα, στους στήμονες και ειδικότερα στα μαύρα στίγματα που βρίσκονται περιφερειακά των ανθέων. Είναι ιδιαίτερα φωτοαντιδραστικές ουσίες, καθώς παρουσία φωτός πραγματοποιούν στον οργανισμό φωτοχημικές αντιδράσεις που ως αποτέλεσμα δύναται να προκαλέσουν φωτοευαισθησία και φωτοδερματίτιδα.

Οι ναφθοδιανθρόλες παρουσιάζουν αντιβακτηριδιακές και αντιϊκές ιδιότητες. Ο μηχανισμός δράσης τους θεωρείται ότι συνίσταται στη μη ειδική δέσμευση τους στις ιογενείς και κυτταρικές μεμβράνες, που έχει ως αποτέλεσμα την φωτοοξειδωση των παθογόνων και στην καταστροφή τους. Επιπλέον οι ουσίες αυτές έχουν την ικανότητα να παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου, καθιστώντας τις ως ισχυρές φωτοευαισθητοποιείς ουσίες.



Εικόνα 1.3 Διαφορά μεταξύ των μορίων της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης.

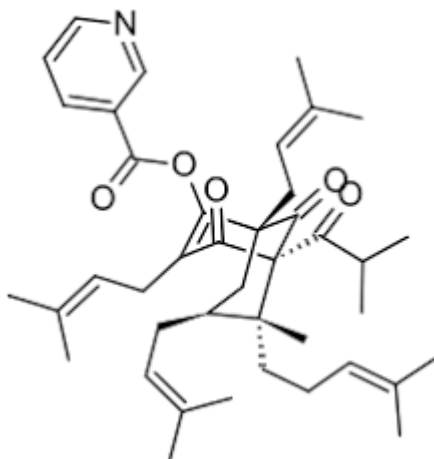
Ο χημικός τύπος της υπερικίνης είναι $C_{30}H_{16}O_8$. Είναι όξινη ουσία και έχει μεγάλο εύρος θεραπευτικών ιδιοτήτων καθώς χρησιμοποιείται ως αντικαταθλιπτικό, αντιικό, κατά των καρκινικών όγκων και θεωρείται χρήσιμο στη θεραπεία του αλκοολισμού. Ο χημικός τύπος της ψευδοϋπερικίνης είναι $C_{30}H_{16}O_9$. Διαφέρει από την υπερικίνη στο γεγονός ότι διαθέτει μια υδροξυμεθυλομάδα στη θέση της μεθυλομάδας της υπερικίνης.

1.9 Υπερφορίνη και Αντι-υπερφορίνη

Η υπερφορίνη θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους μεταβολίτες του υπέρικου και έχουν αποδοθεί σε αυτήν πληθώρα θεραπευτικών δράσεων του. Παρότι τον πρώτο καιρό η αντικαταθλιπτική δράση του υπέρικου είχε αποδοθεί στην υπερικίνη, πρόσφατες έρευνες απέδειξαν ότι την ιδιότητα αυτή κατέχει και η υπερφορίνη. Η υπερφορίνη συναντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα άνθη, στα φύλλα και στους καρπούς. Η υπερφορίνη και οι υπόλοιπες φλορογλουκινόλες είναι ενώσεις που αποικοδομούνται εύκολα κατά την έκθεσή τους στον αέρα και στο φως και για τον λόγο αυτό είναι δύσκολη η μελέτη τους.

Η υπερφορίνη περιέχει 35 άτομα άνθρακα. Είναι ένα προνυλιωμένο φλορογλουκινολικό παράγωγο αποτελούμενο από ένα φλορογλουκινολικό

σκελετό με 5 λιπόφιλες ισοπρενικές αλυσίδες (Εικόνα 1.4). Η αντι- υπερφορίνη είναι ένα φυσικό ομόλογο της υπερφορίνης και η διαφορά τους συνίσταται στην αντικατάσταση μιας ισοπροπυλκετονικής αλυσίδας με μια 2-μεθυλ-προπυλκετόνη. Η περιεκτικότητα της αντι- υπερφορίνης στο υπέρικο είναι έως και 10 φορές μεγαλύτερη από αυτή της υπερφορίνης.



Εικόνα 1.4 Χημική δομή μορίου Υπερφορίνης.

Η φλορογλουκινόλη υπερφορίνη είναι ένας αναστολέας επαναπρόσληψης μονοαμινών, μεταξύ των οποίων της σερετονίνης, της νορεπινεφρίνης, της ντοπαμίνης και της GABA. Αποτελεί μια ισχυρή αντιφλεγμονώδη ένωση με αντιβιοτικές ιδιότητες. Η υπερφορίνη έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει αντιβακτηριδιακές ιδιότητες εναντίον των θετικών κατά Gram βακτηρίων καθώς επίσης και αντιφλεγμονώδη δράση. Αυτές οι ιδιότητες την καθιστούν χρήσιμη στη θεραπεία εκδορών, μολυσμένων πληγών και δερματικών παθήσεων. Επιπλέον *in vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι η υπερφορίνη έχει την ικανότητα αναστολής των καρκινικών κυττάρων χωρίς ιδιαίτερες επιπτώσεις τοξικότητας.

1.10 Παρασκευή βαλσαμέλαιου - Χρήσεις

Το βαλσαμέλαιο, δηλαδή το εκχυλισμένο σε λάδι υπέρικο, έχει μεγάλο εύρος χρήσεων (Εικόνα 1.5). Ως επί το πλείστον είναι γνωστό για την εξωτερική του χρήση για την επούλωση τραυμάτων, εκδορών, ελαφρών εγκαυμάτων, μωλώπων και ηλιακών εγκαυμάτων, ωστόσο η εσωτερική λήψη του βαλσαμέλαιου προτείνεται για πλήθος δυσλειτουργιών. Το βαλσαμέλαιο τονώνει και δίνει ενέργεια σε εξασθενημένους οργανισμούς, λειτουργεί καταπραϋντικά σε περιπτώσεις βήχα και άσθματος και έχει αντικαταθλιπτική και ηρεμιστική δράση καθιστώντας το ιδανικό για βελτίωση του ύπνου των ατόμων που πάσχουν από αϋπνίες. Επιπλέον είναι εμμηναγωγό, διουρητικό, σπασμολυτικό και κατάλληλο για στομαχικές και εντερικές διαταραχές όπως έλκη στομάχου και γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση.



Εικόνα 1.5 Βαλσαμέλαιο.

Η παρασκευή του βαλσαμέλαιου μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους. Μια μέθοδος που μπορεί να ακολουθηθεί συνίσταται στον εμποτισμό των φρέσκων ανθέων του υπέρικου σε ελαιόλαδο, είτε κάποιο άλλο έλαιο επιλογής και η επακόλουθη έκθεση του στο ηλιακό φως για χρονικό διάστημα 4-6 εβδομάδων.

Μια άλλη μέθοδος, με γρηγορότερα αποτελέσματα, είναι η θερμή, κατά την οποία τα άνθη του υπέρικου τοποθετούνται σε ένα πυρέξ και στη συνέχεια καλύπτονται με ελαιόλαδο. Το πυρέξ θερμαίνεται, είτε σε φούρνο είτε σε μπεν

μαρί, και κατά συνέπεια τα συστατικά του υπέρικου περνούν στο λάδι χρωματίζοντάς το κόκκινο.

1.11 Παρασκευή βάμματος υπέρικου – Χρήσεις

Ως βάμμα ορίζεται ένα αλκοολικό εκχύλισμα βοτάνου. Ως αλκοολούχο διάλυμα στη βιομηχανία χρησιμοποιείται κυρίως η αιθανόλη, ωστόσο πολλές φορές χρησιμοποιούνται η μεθανόλη, ο αιθέρας και η προπυλενογλυκόλη. Τα τρία τελευταία είναι ακατάλληλα για εσωτερική κατανάλωση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε σκευάσματα εξωτερικής χρήσης όπως κρέμες και αλοιφές. Στο εργαστήριο, για την εκτέλεση πειραματικών διαδικασιών, είναι συνηθέστερη η χρήση της μεθανόλης.

Η αιθανόλη έχει την ιδιότητα διάλυσης ουσιών που είναι λιγότερο διαλυτές στο νερό. Πλεονεκτεί έναντι των υπολοίπων διαλυτών χάρη στην ιδιότητα που έχει να διαλύει σε υψηλό ποσοστό τόσο όξινα όσο και αλκαλικά συστατικά. Επιπλέον η ίδια η αιθανόλη δρα ως συντηρητικό, παρατείνοντας τη ζωή του παραγόμενου βάμματος.

Οι αλκοόλες έχουν τη δυνατότητα εκχύλισης κυρίως των φλαβονοειδών και των αλκαλοειδών ουσιών των βοτάνων, οι οποίες έχουν αντιβακτηριδιακές, αντϊικές, αναλγητικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Το βάμμα υπέρικου χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της ήπιας μορφής κατάθλιψης, για την εξομάλυνση των συμπτωμάτων αϋπνίας, ως αντϊικό και για τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος.

1.12 Επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στην περιεκτικότητα των δραστικών ουσιών στο υπέρικο.

Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια αποθήκευσης των τροφίμων, με την πάροδο του χρόνου τα θρεπτικά τους συστατικά μειώνονται καθιστώντας το τρόφιμο χαμηλότερης θρεπτικής αξίας από όταν ήταν φρέσκο. Σύμφωνα με έρευνες το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και με τις δραστικές ουσίες του υπέρικου όταν επιδράσει σε αυτό κάποιο χρονικό διάστημα αποθήκευσης. Για τη σωστή αποθήκευση των εκχυλισμάτων υπέρικου, είτε αυτά είναι βάμματα είτε είναι εκχυλίσματα σε λάδι, είναι καλό να προτιμάται ένα σκοτεινό, δροσερό και ξηρό μέρος. Η παρουσία φωτός και οξυγόνου μπορεί να συντελέσει στην πραγματοποίηση αντιδράσεων αλλοίωσης των δραστικών ουσιών του.

Όσον αφορά στη σταθερότητα των ναφθοδιανθρολών, η υπερίκίνη επιδεικνύει μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με την ψευδοϋπερίκίνη στο σκοτάδι. Επιπλέον η σταθερότητα της υπερίκινης στα πρότυπα διαλύματα είναι μικρότερη από ότι στα διαλύματα εκχύλισης. Έχει βρεθεί ότι η αποθήκευση των εκχυλισμάτων υπέρικου στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία -20°C , είναι ο καλύτερος συνδυασμός για τη μεγαλύτερη σταθερότητα των ναφθοδιανθρολών. Παράλληλα, το pH είναι ένας σημαντικός παράγοντας που μπορεί να οδηγήσει στην αλλοίωση των ουσιών αυτών. Τόσο σε όξινες όσο και σε αλκαλικές συνθήκες παρατηρείται αποικοδόμηση των ναφθοδιανθρολών. Ωστόσο οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή εκχυλισμάτων υπέρικου είναι γνωστό ότι δεν διαθέτουν pH, καθώς απουσιάζει από αυτούς το νερό. Τέλος, λόγω της ευαισθησίας που παρουσιάζουν οι ουσίες υπερίκίνη και ψευδοϋπερίκίνη στα πρότυπα διαλύματα είναι σημαντική η σωστή αποθήκευσή τους, καθώς τα πρότυπα διαλύματά τους παρουσιάζουν μείωση κατά 20% στην περιεκτικότητά τους μετά από παραμονή 4 ημερών σε θερμοκρασία δωματίου (Karioti et al., 2010).

Οι φλορογλουκινόλες σε σύγκριση με τις ναφθοδιανθρόλες είναι περισσότερο ασταθείς ουσίες και αυτό οφείλεται κυρίως στους σταθερότερης δομής αρωματικούς δακτυλίους που σχηματίζουν οι τελευταίες. Η υπερφορίνη διαφαίνεται ευαίσθητη τόσο σε όξινες όσο και σε αλκαλικές συνθήκες. Συγκεκριμένα σε όξινες συνθήκες, μετά το πέρασ 48 ωρών καταστρέφεται η μισή

περιεκτικότητα σε υπερικίνη, ενώ σε αλκαλικό περιβάλλον σε 12 ώρες η υπερικίνη καταστρέφεται πλήρως.

2. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης σε εκχυλίσματα μεθανόλης και ελαιόλαδου, κατεψυγμένου νωπού υπέρικου και η σύγκριση των τιμών αυτών με τις αντίστοιχες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε προηγούμενη πτυχιακή διατριβή σε εκχυλίσματα μεθανόλης και ελαιόλαδου φρέσκου υπέρικου.

3. Υλικά και μέθοδοι

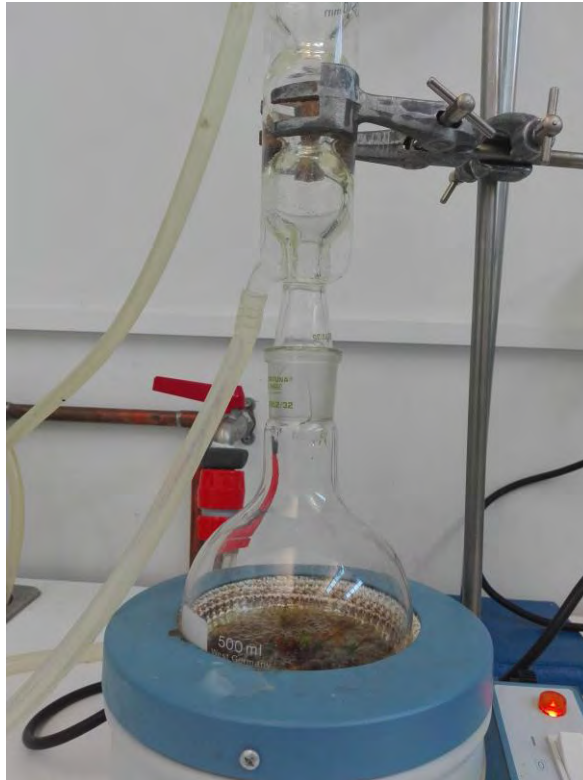
3.1. Φυτικό Υλικό

Για τις ανάγκες του πειράματος παραλήφθηκε από εμπορικό ψυγείο της περιοχής του Βόλου επαρκής ποσότητα κατεψυγμένου χλωρού φυτού υπέρικου (*Hypericum perforatum*) το οποίο είχε τοποθετηθεί στην κατάψυξη από τον προηγούμενο χρόνο, στους -4 °C. Το δείγμα αυτό είχε συλλεχθεί στις 10/06/15 από το Σέσκλο Μαγνησίας με σκοπό την χρήση του στην διεξαγωγή προηγούμενης πτυχιακής διατριβής. Ποσότητα από αυτό αποθηκεύτηκε για τη μελλοντική μελέτη της επίδρασης του χρόνου στην περιεκτικότητα της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης η οποία έγινε κατά την παρούσα πτυχιακή εργασία.

Κατά την παραλαβή του υπέρικου από το εμπορικό ψυγείο, τον Νοέμβριο του 2016, έγινε η δειγματοληψία. Από τη συνολική ποσότητα του υπέρικου παραλήφθηκαν τυχαία 5 δείγματα των 2 g με σκοπό την εκχύλισή τους σε μεθανόλη και 5 δείγματα των 60 g με σκοπό την εκχύλισή τους σε ελαιόλαδο. Στη συνέχεια καθένα από τα δείγματα τοποθετήθηκε σε ατομική πλαστική σακούλα σε ψυγείο του Πανεπιστημίου, στους 2-3 °C, έως και τη λήξη του πειράματος, τον Δεκέμβριο του 2016.

3.2. Εκχύλιση σε μεθανόλη

Αρχικά έγινε ο τεμαχισμός του υπέρικου σε μικρά κομμάτια, ώστε να είναι δυνατή η μέγιστη εκχύλισή του, και η προσθήκη του μαζί με 100 ml μεθανόλης σε σφαιρική φιάλη. Στη συνέχεια θερμάνθηκε σε διάταξη θερμομανδύα (Εικόνα 3.1). Το σκεύασμα παρέμεινε σε συνθήκες βρασμού για μισή ώρα και στη συνέχεια αφέθηκε για 10 λεπτά να ψυχθεί. Ακολούθως έγινε διήθηση του μείγματος με διηθητικό χαρτί (Εικόνα 3.2), και τελικά τοποθέτησή του εκχυλίσματος σε αδιαφανή φιάλη (χρώματος καραμελέ), έτσι ώστε να αποφευχθεί περεταίρω η οξείδωση. Η φιάλη σφραγίστηκε με parplast και παρέμεινε σε σκιερό και δροσερό μέρος. Το τελικό εκχύλισμα ήταν σε κάθε περίπτωση 90 ml.



Εικόνα 3.1 Διάταξη θερμομανδύα. Παρασκευή βάμματος υπέρικου.



Εικόνα 3.2 Διήθηση βάμματος με διηθητικό χαρτί.

3.3. Εκχύλιση σε ελαιόλαδο

Αντιστοίχως, η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εκχύλιση του υπέρικου σε ελαιόλαδο ήταν η εξής. Για κάθε 60 g μεμονωμένου δείγματος νωπού υπέρικου χρησιμοποιήθηκαν 300 ml λάδι. Έγιναν δύο επαναλήψεις με τη χρήση των δειγμάτων. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μεταλλικό σκεύος αφού πρώτα έγινε τεμαχισμός τους, μαζί με την αντίστοιχη ποσότητα ελαιόλαδου. Στη συνέχεια το μεταλλικό σκεύος τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 50 °C για 5 ημέρες (Εικόνα 3.3). Τα δείγματα εκχυλίστηκαν με πίεση ώστε να παραληφθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα λαδιού ενώ το στερεό φυτικό υλικό απορρίφθηκε. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε διήθηση του λαδιού και το υλικό τοποθετήθηκε του σε αδιαφανή φιάλη (χρώματος καραμελέ) η οποία παρέμεινε σε σκιερό μέρος έτσι ώστε να αποφευχθεί περεταιίρω η οξείδωση. (Εικόνα 3.4).



3.3 Υδατόλουτρο, εκχύλιση υπέρικου σε λάδι.



3.4 Διήθηση βαλσαμέλαιου με βαμβάκι.

3.4. Υπολογισμός της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης

Για τη μέτρηση της περιεκτικότητας της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης των δειγμάτων που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν δύο τεχνικές, η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) και η φασματοφωτομετρία (UV-VIS). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα μεθανολικά βάμματα και στα εκχυλίσματα σε ελαιόλαδο (βαλσαμέλαιο) που έγιναν για το σκοπό αυτό. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα μεθανολικά βάμματα, εκφράζονται σε % β/β, δηλαδή γραμμάρια υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης αντίστοιχα ανά 100 γραμμάρια φυτικού ιστού, ενώ τα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων ελαιόλαδου εκφράζονται σε γραμμάρια υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης αντίστοιχα ανά 100 ml ελαιόλαδου.

3.4.1. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης στα μεθανολικά βάμματα και στο βαλσαμέλαιο χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας τύπου Hewlett-Packard 1100 Series (Εικόνα 3.5) που αποτελείται από:

- Σύστημα έγχυσης Reodyne με βρόγχο χωρητικότητας 20μL.
- Χρωματογραφική στήλη Zorbax SB – C18, διαστάσεων 150x4,6mm
- Ανιχνευτή απορρόφησης UV-Vis με καταγραφή ορισμένη στα 588nm.

Η καταγραφή και επεξεργασία του χρωματογραφικού σήματος έγινε με Η/Υ με το πρόγραμμα Chem-Station της Hewlett Packard.

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution), η οποία φαίνεται στον Πίνακα 3.1. Οι δύο κινητές φάσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Α: H₂O (5% μεθανόλη) και Β: MeOH. Η ροή του ήταν 1ml/min. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε σταθερή στους 40 °C.

Πίνακας 3.1 Πρόγραμμα Χρωματογραφικής Ανάλυσης.

ΧΡΟΝΟΣ (min)	A% (H ₂ O)	B% (MeOH)
0	55	45
7	55	45
12	0	100
15	0	100
19	55	45
20	55	45

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης στα μεθανολικά βάμματα και στα εκχυλίσματα ελαίου έγινε με την τεχνική του εξωτερικού προτύπου, ενώ η ταυτοποίηση των δύο ουσιών στα χρωματογραφήματα βασίστηκε στους χρόνους κατακράτησης (t_R), όπως προέκυψαν από τις εκχύσεις προτύπων διαλυμάτων υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης.



Εικόνα 3.5 Σύστημα υγρής χρωματογραφίας τύπου Hewlett-Packard 1100 Series.

3.4.2. Φασματοφωτομετρία

Για τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των ναφθοδιανθρολών (υπερικήνη και ψευδοϋπερικήνη) στα μεθανολικά βάμματα χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού τύπου OPTIZEN Pop της Mecacys (Εικόνα 3.6). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στα 588 nm και η ποσότητά τους υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο:

$\Sigma\text{Hyr (g\%)} = (A \cdot 100) / (780 \cdot m)$, όπου:

ΣHyr : το σύνολο της υπερικήνης και ψευδοϋπερικήνης (σε % β/β ξηρού φυτικού ιστού)

A: η μετρηθείσα απορρόφηση

m: τα γραμμάρια του άνθους που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή 100 ml εκχυλίσματος

780: η ειδική απορρόφηση των ναφθοδιανθρολών στα 588 nm

(Gitea et al, 2010)



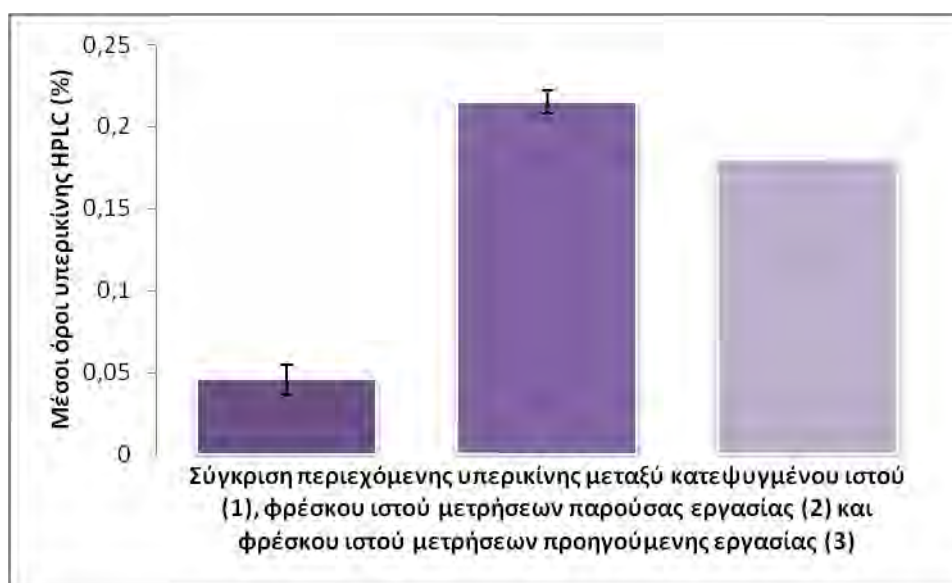
Εικόνα 3.6 Φασματοφωτόμετρο τύπου OPTIZEN Pop της Mecacys.

4. Αποτελέσματα

4.1 Περιεκτικότητα υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης στα εκχυλίσματα μεθανόλης (βάμματα) κατεψυγμένου φυτικού ιστού (HPLC).

Τα ποσοστά της περιεκτικότητας των μεθανολικών βαμμάτων σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη, που προέκυψαν από τις μετρήσεις των προερχόμενων από κατεψυγμένο φυτικό ιστό δειγμάτων με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες τιμές περιεκτικότητας των μεθανολικών βαμμάτων που προήλθαν από φρέσκο φυτικό ιστό.

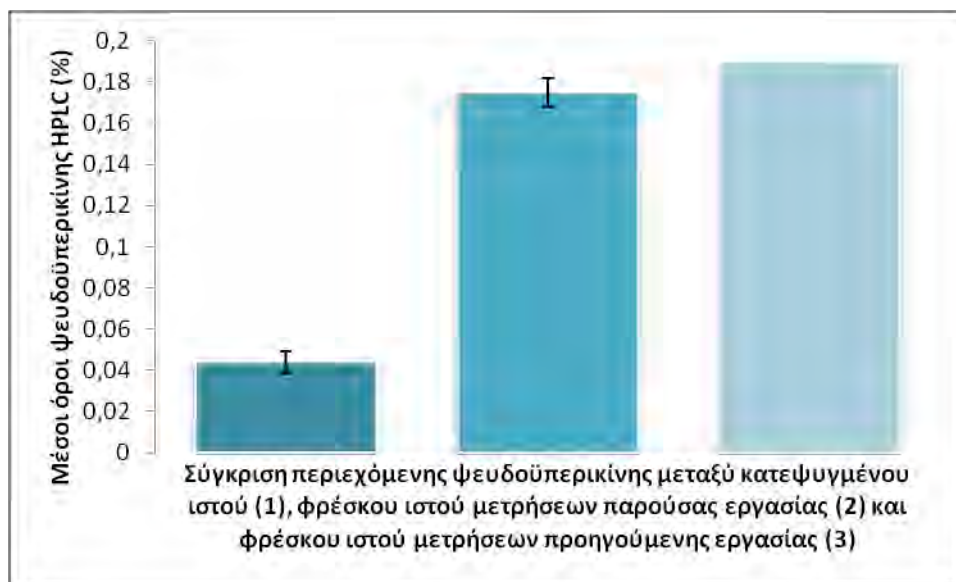
Η ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων και η σύγκριση της περιεχόμενης υπερικίνης μεταξύ του κατεψυγμένου και του φρέσκου φυτικού υλικού παρουσιάζεται στο Γράφημα 4.1. Τα αποτελέσματα δείχνουν μια εμφανή μείωση της περιεκτικότητας του φυτικού ιστού που συντηρήθηκε στην κατάψυξη (1), σε υπερικίνη, σε σχέση με το φρέσκο φυτικό ιστό (2). Τα συγκρινόμενα στοιχεία παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Επιπλέον, έγινε σύγκριση των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία (1 και 2) με τις μετρήσεις που λήφθηκαν από το φρέσκο υπέρικο στην προηγούμενη πτυχιακή εργασία (3). Μεταξύ των τιμών (1) και (3) παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά. Οι τιμές (2) και (3) δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές.



Γράφημα 4.1 Μέσοι όροι συγκέντρωσης υπερικίνης, που προσδιορίστηκε χρωματογραφικά, στο κατεψυγμένο και στο φρέσκο υπέρικο. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD).

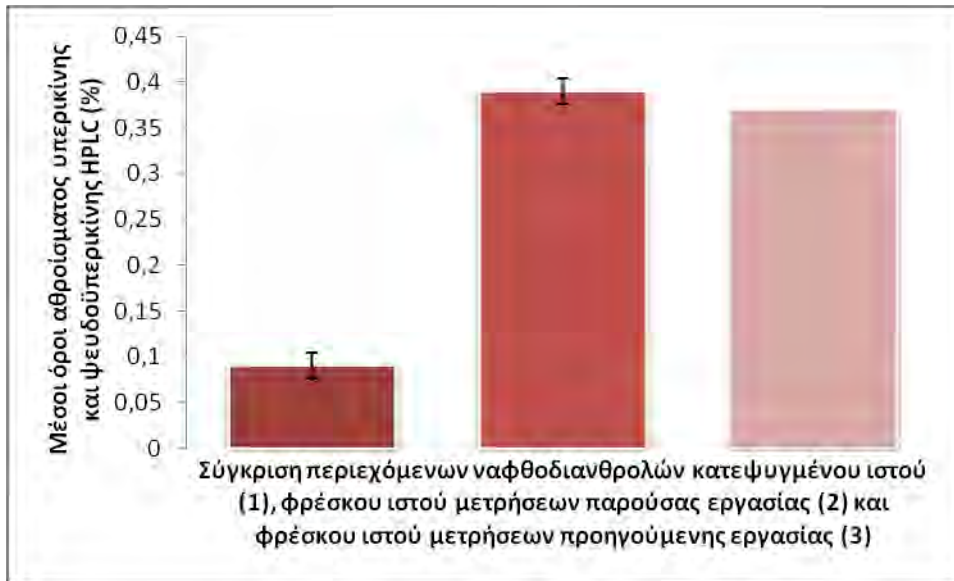
Αντιστοίχως κατά την ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων για τη σύγκριση της περιεχόμενης ψευδοϋπερικίνης μεταξύ του κατεψυγμένου (1) και του φρέσκου φυτικού ιστού που προσδιορίστηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία (2) και στην προηγούμενη (3), παρατηρείται σημαντική μείωση της περιεκτικότητας

ψευδοϋπερικίνης στο φυτικό υλικό που υπέστη συνθήκες κατάψυξης (Γράφημα 4.2). Σημαντική στατιστική διαφορά παρουσιάζεται τόσο μεταξύ των (1) και (2), όσο και των (1) και (3). Μεταξύ των μετρήσεων (2) και (3) δεν παρουσιάζεται σημαντική στατιστική διαφορά.



Γράφημα 4.2 Μέσοι όροι συγκέντρωσης ψευδοϋπερικίνης, που προσδιορίστηκε χρωματογραφικά, στο κατεψυγμένο και στο φρέσκο υπέρικο. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD).

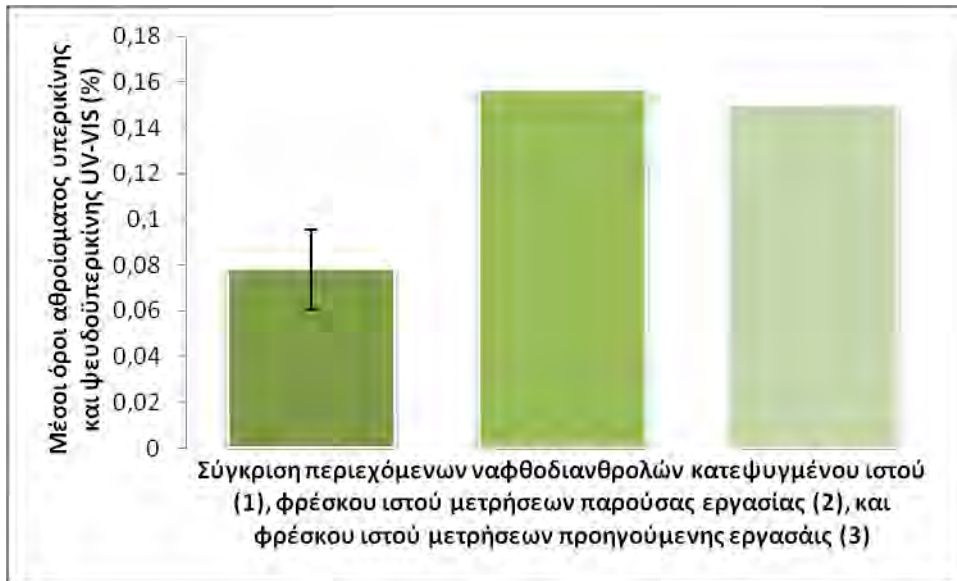
Ως επακόλουθο, το άθροισμα των υπερικινών και ψευδοϋπερικινών στα μεθανολικά βάμματα που προήλθαν από κατεψυγμένο φυτικό ιστό (1), παρουσιάζει τιμές τέσσερις φορές μικρότερες από τα μεθανολικά βάμματα που προήλθαν από φρέσκο φυτικό ιστό (2) (Γράφημα 4.3). Μεταξύ των αποτελεσμάτων (1) και (2) καθώς και μεταξύ των αποτελεσμάτων (1) και (3), παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά. Μεταξύ των τιμών που προήλθαν από μετρήσεις μεθανολικών εκχυλισμάτων φρέσκου υπέρικου στις δύο πτυχιακές εργασίες, (2) και (3), δεν παρουσιάζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά.



Γράφημα 4.3 Μέσοι όροι συγκέντρωσης αθροίσματος υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης, που προσδιορίστηκε χρωματογραφικά, στο κατεψυγμένο και στο φρέσκο υπέρικο. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD).

4.2 Περιεκτικότητα αθροίσματος υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης στα εκχυλίσματα μεθανόλης (βάμματα) κατεψυγμένου φυτικού ιστού (UV-VIS).

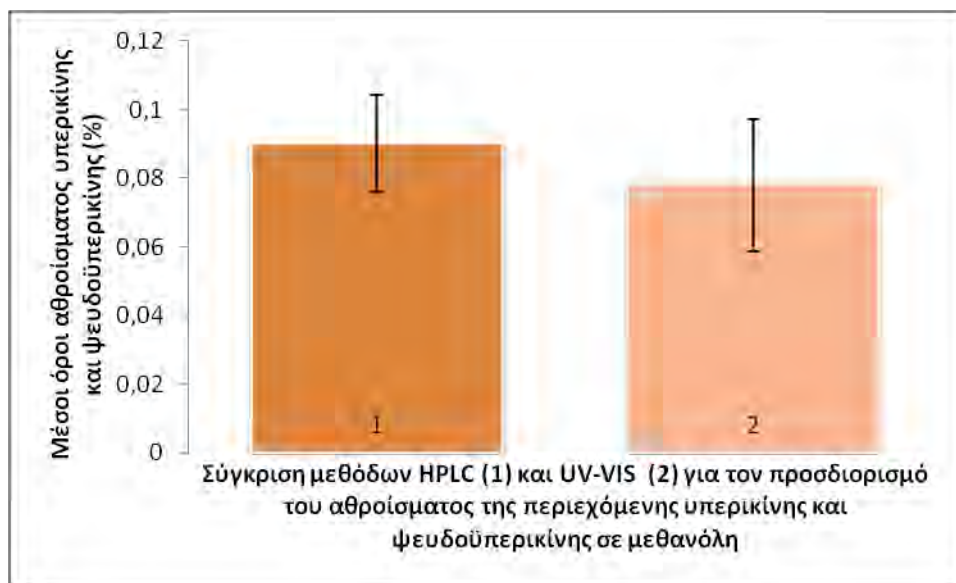
Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης στα μεθανολικά βάμματα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις φασματοφωτομετρικά και συγκρίθηκαν οι τιμές του εκχυλίσματος κατεψυγμένου φυτικού ιστού (1), του εκχυλίσματος φρέσκου φυτικού ιστού που λήφθηκαν στην παρούσα εργασία (2) και του εκχυλίσματος φρέσκου φυτικού ιστού που λήφθηκαν στην προηγούμενη εργασία. Τα αποτελέσματα στην περίπτωση του κατεψυγμένου φυτικού ιστού ήταν επίσης μειωμένα, ωστόσο η μείωση αυτή ήταν μικρότερη σε σχέση με τις μετρήσεις που λήφθηκαν χρωματογραφικά. Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα των ναφθοδιανθρολών υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη στο κατεψυγμένο φυτικό ιστό (1) παρουσιάζεται μειωμένη περίπου στο $\frac{1}{2}$ της αντίστοιχης περιεκτικότητας στο φρέσκο φυτικό ιστό (2). Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά. Οι τιμές του φρέσκου φυτικού ιστού (3) παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά με τις τιμές του κατεψυγμένου υπέρικου (1), ενώ δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά με τις τιμές του φρέσκου φυτικού ιστού (2).



Γράφημα 4.4 Μέσοι όροι συγκέντρωσης αθροίσματος υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης, που προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά στο κατεψυγμένο και στο φρέσκο υπέρικο. Η κάθετη μπάρα δηλώνει την τυπική απόκλιση (SD).

4.3 Περιεκτικότητα αθροίσματος υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης κατεψυγμένου φυτικού ιστού στα εκχυλίσματα μεθανόλης (βάμματα) μετρημένα με HPLC και UV-VIS.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν χρωματογραφικά και φασματοφωτομετρικά, μεγαλύτερες είναι οι τιμές που προέκυψαν από τον χρωματογράφο (Γράφημα 4.5). Τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους.



Γράφημα 4.5 Μέσοι όροι συγκέντρωσης υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης στα μεθανολικά εκχυλίσματα που προσδιορίστηκαν χρωματογραφικά και φασματοφωτομετρικά. Οι κάθετες μπάρες δηλώνουν την τυπική απόκλιση (SD).

4.4 Περιεκτικότητα αθροίσματος υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης κατεψυγμένου φυτικού ιστού στα εκχυλίσματα ελαιόλαδου (HPLC).

Στον Πίνακα 4.1, παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το χρωματογραφικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης στο εκχύλισμα ελαιόλαδου που προήλθε από κατεψυγμένο φυτικό ιστό. Η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των εκχυλισμάτων ελαιόλαδου ήταν 60 g φυτικού ιστού ανά 300 ml ελαιόλαδου. Μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο δειγμάτων διακρίνεται μεγάλη διαφορά τιμών.

Πίνακας 4.1 Ποσοστό περιεκτικότητας υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης (% β/β χλωρού ιστού) κατεψυγμένου υπέρικου

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΕΛΑΙΟΥ (ml)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΙΣΤΟΥ (g)	ΗΥΡ&ΨΗΥΡ % HPLC
1	900	180	0,00017
2	600	120	0,00001

5. Συζήτηση

5.1 Επίδραση κατάψυξης στην περιεκτικότητα της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, η συντήρηση επιφέρει σταδιακή αλλοίωση και μείωση της περιεκτικότητας των ωφέλιμων ουσιών στο συντηρούμενο προϊόν. Επομένως η μείωση της περιεκτικότητας των ναφθοδιανθρολών στο κατεψυγμένο υπέρικο συγκριτικά με το φρέσκο υπέρικο ήταν αναμενόμενη. Μάλιστα, η ψευδοϋπερικίνη εμφάνισε μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης σε σχέση με την υπερικίνη, κάτι που οφείλεται όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, στην μικρότερη σταθερότητα που τη χαρακτηρίζει σε σχέση με την υπερικίνη, κατά την παραμονή της στο σκοτάδι.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων με τη μέθοδο HPLC στα μεθανολικά εκχυλίσματα, συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά στο άθροισμα των συγκεντρώσεων της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης που κυμαίνεται από 0,1% έως 0,3% (Anyzewska et al. 2010). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του κατεψυγμένου φυτικού ιστού παρουσιάζουν μέσο όρο 0.09%, ποσοστό που δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις προαναφερθείσες τιμές.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των μεθανολικών εκχυλισμάτων που έγιναν φασματοφωτομετρικά παρουσιάζονται εντός ορίων σε σχέση με τα αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας που κυμαίνονται μεταξύ 0.025% και 0,23% (Gitea et al. 2010). Ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν φασματοφωτομετρικά ήταν 0,08% στο κατεψυγμένο υπέρικο, ενώ στο φρέσκο υπέρικο ήταν διπλάσιος.

Ωστόσο, ενώ οι τιμές που προέκυψαν από τα μεθανολικά εκχυλίσματα είναι αρκετά κοντά με τις βιβλιογραφικές αναφορές, το ελαιόλαδο παρουσίασε ιδιαίτερα χαμηλές τιμές, που απέχουν σε μεγάλο βαθμό από την προτεινόμενη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι σε μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με HPLC σε εκχυλίσματα υπέρικου στο ελαιόλαδο με αναλογία 1:5, η συγκέντρωση των ναφθοδιανθρολών ήταν 0,003% (Arsić et al. 2010). Ο μέσος όρος όμως των τιμών των μετρήσεων της παρούσας εργασίας ήταν 0,00009%. Επιπλέον υπήρξε μεγάλη απόκλιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των δύο δειγμάτων ελαιόλαδου. Και τα δύο αυτά γεγονότα είναι πιθανό να οφείλονται, πέραν της συντήρησης του φυτού στην κατάψυξη, στην υποβάθμιση του υπέρικου, που μετά την απόψυξή του και κατά τη διάρκεια του πειράματος διατηρήθηκε στους 2-3 °C, Κατά το στάδιο παρασκευής του πρώτου εκχυλίσματος ελαιόλαδου παρατηρήθηκε μικρή παρουσία μούχλας στα άνθη και στα στελέχη του φυτού, η οποία είχε εξαπλωθεί αρκετά κατά την παρασκευή του δεύτερου εκχυλίσματος ελαιόλαδου. Το γεγονός αυτό εξηγεί την μεγάλη διαφορά τιμών μεταξύ των δύο εκχυλισμάτων ελαιόλαδου και κατά συνέπεια την μεγάλη

απόκλιση των τιμών περιεκτικότητας σε ναφθοδιανθρόλες, καθώς επίσης και την σε τόσο μεγάλο βαθμό απόκλιση της περιεκτικότητας από αυτή που προτείνει η διεθνής βιβλιογραφία.

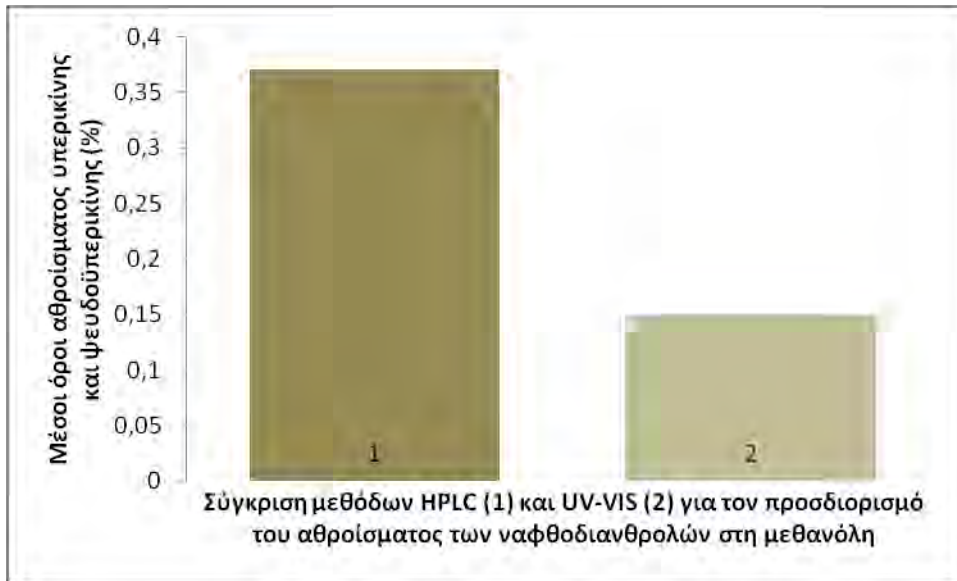
Τέλος, το χαμηλότερο ανεκτό όριο περιεκτικότητας σε σύνολο υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης που θεωρείται ασφαλές για την φαρμακευτική ποιότητα των σκευασμάτων υπέρικου, είναι 0,08% β/β φυτικού ιστού (Gitea et al. 2010). Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν στα μεθανολικά βάμματα, είναι φανερό ότι παρότι με τη συντήρηση του φυτικού ιστού στην κατάψυξη παρατηρείται μείωση στις ναφθοδιανθρόλες, η μειωμένες αυτές τιμές δεν υπερβαίνουν το κατώτερο όριο, κάτω από το οποίο τα παραγόμενα σκευάσματα δεν θα προσέφεραν σημαντικά αποτελέσματα.

5.2 Επίδραση μέσου εκχύλισης στην περιεκτικότητα της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης

Μεταξύ των αποτελεσμάτων των συγκεντρώσεων των ναφθοδιανθρολών στα εκχυλίσματα μεθανόλης και στα εκχυλίσματα ελαιόλαδου δεν μπόρεσε να γίνει συσχέτιση καθώς τα αποτελέσματα που προέκυψαν στα εκχυλίσματα μεθανόλης είναι υπολογισμένα σε % g ναφθοδιανθρολών/ g φυτικού ιστού, ενώ στα εκχυλίσματα ελαιόλαδου είναι υπολογισμένα σε % g ναφθοδιανθρολών/ 100 ml ελαιόλαδου . Ωστόσο, η μεθανόλη και οι αλκοόλες γενικότερα, έχουν την ικανότητα εκχύλισης μεγαλύτερου ποσοστού ουσιών συγκριτικά με το ελαιόλαδο, καθιστώντας τη ενδεχομένως καταλληλότερη μέθοδο για την παρασκευή φαρμακευτικών σκευασμάτων.

5.3 Επίδραση των μεθόδων προσδιορισμού στον υπολογισμό της περιεκτικότητας της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης

Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης στα μεθανολικά βάμματα χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι HPLC και UV-VIS. Η πρώτη μέθοδος έδωσε ελαφρώς μεγαλύτερα αποτελέσματα από αυτά που προέκυψαν από το φασματοφωτόμετρο. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην πιθανή μεγαλύτερη ευαισθησία του χρωματογράφου στην αποτύπωση των συγκεντρώσεων των προς μέτρηση ουσιών σε σχέση με το φασματοφωτόμετρο. Άλλωστε τα αποτελέσματα των μετρήσεων που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά, γεγονός που πιστοποιεί την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων που προέκυψαν και από τις δύο μεθόδους. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων στην προηγούμενη πτυχιακή επίσης προέκυψαν ελαφρώς αυξημένες τιμές συγκεντρώσεων των δειγμάτων που μετρήθηκαν χρωματογραφικά συγκριτικά με τα δείγματα που μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά. (Γράφημα 5.1).



Γράφημα 5.1 Μέσοι όροι συγκέντρωσης υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης στα μεθανολικά εκχυλίσματα που προσδιορίστηκαν χρωματογραφικά και φασματοφωτομετρικά κατά την προηγούμενη πτυχιακή εργασία.

6. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων προέκυψε πως η συντήρηση του υπέρικου σε συνθήκες κατάψυξης για χρονικό διάστημα ενός έτους περίπου, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση την περιεκτικότητάς του σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη σε μεγάλο βαθμό σε σχέση με την αντίστοιχη περιεκτικότητα του φρέσκου υπέρικου. Ωστόσο, οι συγκεκριμένες συνθήκες αποθήκευσης επιτρέπουν την διατήρηση ενός ποσοστού υπερικίνης και ψευδοϋπερικίνης στο φυτό, που υπό άλλες συνθήκες συντήρησης δεν θα ήταν εφικτή. Επιπλέον οι τιμές αυτές είναι σύμφωνες με τις αντίστοιχες τιμές της προτεινόμενης διεθνούς βιβλιογραφίας.

Το μέσο εκχύλισης του υπέρικου φαίνεται να συμβάλλει σημαντικά στην περιεκτικότητα σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν αρκετά μειωμένη περιεκτικότητα των παραπάνω ουσιών στα εκχυλίσματα ελαιόλαδου συγκριτικά με τις αντίστοιχες βιβλιογραφικές αναφορές, ενώ αντιθέτως τα εκχυλίσματα μεθανόλης δεν παρουσίασαν αποκλίσεις από τη διεθνή βιβλιογραφία. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, είναι πιθανό, αυτή η μεγάλη απόκλιση τιμών των εκχυλισμάτων ελαιόλαδου από τις βιβλιογραφικές πηγές, να οφείλεται κυρίως στην υποβάθμιση του φυτικού υλικού και να μην σχετίζεται με το μέσο εκχύλισης.

Η μεθοδολογία μέτρησης φαίνεται ότι επηρεάζει σε πολύ μικρό βαθμό, την εκτίμηση της περιεκτικότητας του υπέρικου σε υπερικίνη και ψευδοϋπερικίνη. Τα αποτελέσματα των εκχυλισμάτων σε μεθανόλη ήταν υψηλότερα στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν χρωματογραφικά συγκριτικά με τις αντίστοιχες μετρήσεις του φασματοφωτόμετρου.

Συμπερασματικά και λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η συντήρηση του υπέρικου σε συνθήκες κατάψυξης με σκοπό την χρήση του κατά τις περιόδους του έτους που δεν υπάρχει ανθοφορία του φυτού, είναι δυνατή. Ωστόσο, βάσει των αποτελεσμάτων, συστήνεται η χρήση μιας αλκοόλης ως μέσου εκχύλισης για την παρασκευή φαρμακευτικών σκευασμάτων, και διατηρείται μια επιφύλαξη για την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων από εκχύλιση υπέρικου σε ελαιόλαδο.

7. Βιβλιογραφία

Ξένη βιβλιογραφία:

- Anyzewska M, Kowalczyk A, Lozak A, Jablczynska R and Fijalek Z. 2010. Determination of total hypericins in St. John's Wort and herbal medicinal products. Medical University of Warsaw, Department of Drugs Analysis, Vol.67 No.6 p.587-593.
- Arsić I, Žugić A, Antić DR, Zdunić G, Dekanski D, Marković G and Tadić V. 2010. *Hypericum Perforatum L.* Hypericaceae/Guttiferae Sunflower Olive and Palm Oil Extracts Attenuate Cold Restraint Stress-Induced Gastric Lesions. Institute for Medicinal Plant Research and Biomedical Research, 15, p.6688-6698
- Barnes J, Anderson LA and Phillipson JO. 2001. St. John's wort (*Hypericum perforatum L.*): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties, J Pharm Pharmacol, Vol 53, Issue 5,p 583-800
- Derun EM, Eslek Z and Piskin S. 2013. Extraction and Analysis of *Hypericum perforatum L.* from Turkey. World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Chemical and Molecular Engineering, Vol 7, Mo:7.
- DerMarderosian A. and Beutler JA. 2002. The review of natural products
- Fox FE, Niu Z, Tobia A and Rook AH.1998. Photoactivated hypericin in an anti-proliferative agent that includes a high rate of apoptotic death of normal, transformed ,and malignant T Lymphocytes: Implications for the treatment of cutaneous lymphoproliferative and inflammatory disorders, Journal of Investigative Dermatology, Vol 11, Issue 2, p 327-332
- Gitea D, Sipos M, Mircea T and Pasca B. 2010. The analysis of alcoholic extracts of *Hypericum* species by UV/VIS Spectrophotometry. Analele Universitatii din Oradea – Fascicula Biologie, Tom XVII / 1, p.111-115.
- Hostanka K, Bommer S, Weber M, Krasnigi B and Saller R. 2003. Comparison of the growth-inhibitory effect of *Hypericum perforatum L.* extracts, differing in the concentration of phloroglucinols and flavonoids, on leukaemia cells, J Pharm Pharmacol, p 973-980
- Karioti A and Bilia AR. 2010. Hypericins as potential leads for new therapeutics, Int. J. Mol. Sci., Vol 11, Issue 2, p 562-594

- Kitanov GM. 2001. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Sofia. Biochemical Systematics and Ecology, p.171-178.
- Klemow KM, Bartlow A, Crawford J, Kocker N, Shah J and Ritsick M. 2011. Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*), NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health.
- Koyu H and Haznedaroglu MZ. 2015. Investigation of impact of storage conditions on *Hypericum perforatum* L. dried total extract. Journal of Food and Drug Analysis, 23, p. 545-551.
- Lavie G, Mazur Y, Lavie D and Meruelo D. 1995. The chemical and biological properties of hypericin- A compound with a broad spectrum of biological activities, Medicinal Research Reviews, Vol 15, No 2, p 111-119
- Müller WE, Singer A and Wonnemann M. 2001. Hyperforin-Antidepressant activity by a novel mechanism of action, Pharmacopsychiatry 34, p 98-102
- Phillipp M, Kohnen R and Hiller KO. 1999. *Hypericum* extract versus imipramine or placebo in patients with moderate depression: randomized multicentre study of treatment for eight weeks. BMJ, p 1534-1538
- Saddiqe Z, Naeem I and Maimoona A. 2010. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L., Journal of Ethnopharmacology, Vol 131, Issue 3, p 511-521
- Stempp CM, Kirkin V, Haarhaus BS, Kersten A, Kiss J, Termeer CC, Gilb B, Kaufmann T, Borner C, Sleeman JP and Simon JC. 2002. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis, p 1242-1250
- Tang J, Colacino JM, Larsen SH and Spitzer W. 1990. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. Antiviral Research, Vol 13, Issue 6, p 313-325
- Zou Y, Lu Y and Wei D. 2004. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro, J Agric Food Chem, Vol 11, p 5032-5039
- Zou Y, Lu Y and Wei D. 2010. Protective effects of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. against hydrogen peroxide- induced apoptosis in PC12 cells, Phytotherapy Research, Vol 24, Issue S1

Ελληνική βιβλιογραφία:

- Αντωνάκη Ε. 2011. Επίδραση των επιβραδυντών αύξησης και της φωτοπεριόδου στη παραγωγή νανοποιημένων γλαστρικών φυτών του είδους *Hypericum androsaemum*. Πτυχιακή Εργασία.
- Γκόρτσου Γ-Α. 2018. Εκτίμηση της συγκέντρωσης της υπερικίνης και της ψευδοϋπερικίνης σε εκχύλισμα διαφορετικών οικότυπων του *Hypericum perforatum*, σε μεθανόλη και ελαιόλαδο. Πτυχιακή Εργασία
- Κουτσός Θ. Β. 2006. Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά σελ. 83-88
- Κυνηγαλάκης Μ. 2014. Βιταμίνες, Βότανα και Ιχνοστοιχεία για την Υγεία Ζώων και Ανθρώπων. Διπλωματική Εργασία.
- Λιεπούρη Ε. 2016. Ελληνικά Βότανα και οι Χρήσεις τους. Θεραπευτικές και άλλες χρήσεις. Πιθανές χρήσεις στην αρχιτεκτονική τοπίου και στην ανθοκομία. Πτυχιακή Εργασία.
- Μαργιάννη Ε. 2011. Φυτοχημική Ανάλυση Εκχυλίσματος Πόας Υπέρικου. Διπλωματική Εργασία

Διαδικτυακές πηγές:

- [en Wikipedia.org/wiki/High-performance_liquid_chromatography](https://en.wikipedia.org/wiki/High-performance_liquid_chromatography)
- [en Wikipedia.org/wiki/Hyperforin](https://en.wikipedia.org/wiki/Hyperforin)
- [en Wikipedia.org/wiki/Hypericin](https://en.wikipedia.org/wiki/Hypericin)
- [en Wikipedia.org/wiki/Tincture](https://en.wikipedia.org/wiki/Tincture)
- el.wikipedia.org/wiki/Βάλσαμο
- eol.org/pages/584888/overview
- beautyelixirs.blogspot.com/2006/06/blog-post.html
- chimikoergastirio.blogspot.com/2009/12/hplc.html