



Dipartimento di Scienze del Farmaco
Università degli Studi di Pavia

DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI IPERICINA E IPERFORINA NELL'ESTRATTO DI IPERICO FORNITO DALLA AZIENDA "DOTT. STEFANO FARALLI SCARL" (vedi scheda tecnica allegata)

Reagenti:

- ipericina standard (Phytolab GmbH & Co. KG Germany);
- iperforina standard (Phytolab GmbH & Co. KG Germany);
- acetonitrile per MS e per HPLC (Sigma Aldrich);
- acido formico per MS e per HPLC;
- etile acetato 99% (Carlo Erba)

Campione:

Estratto di iperico fornito dalla Azienda "Dott. Stefano Faralli scarl" con sede in Milano, Piazzale Cadorna 9, 20123 Milano P. IVA 06749480965 e consegnato in data 7 gennaio 2013.
Scheda tecnica del prodotto.

Metodo HPLC-DAD

La determinazione dell'iperforina è stata condotta mediante il metodo di Camas et al. (Scientific World Journal. 2012; 2012:501027. doi: 10.1100/2012/501027. *Secondary metabolites of Hypericum leptophyllum Hochst., an endemic Turkish species*. Camas N, Radusiene J, Stanius Z, Caliskan O, Cirak C.) con alcune modifiche:

- Sistema HPLC-DAD Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany): costituito da una pompa quaternaria, auto-campionatore con termostato dotato di loop di iniezione da 5 μ l, termostato per colonna, rivelatore DAD. Per il controllo del sistema e l'analisi dei dati è stato impiegato il software Chemstation,
- Fase stazionaria: ZORBAX SB C18 150x4,6 mm - 5 μ m (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany);
- Fase mobile: acetonitrile allo 0,1% di acido formico (isocratica);
- Velocità di flusso: 1 ml/min;
- Temperatura della colonna: 40°C;
- Durata analisi: 20 minuti.
- λ = 270nm



Dipartimento di Scienze del Farmaco – sede amministrativa Viale Taramelli 12 –27100 PAVIA
Tel. +39-0382-987358-7362 Fax +39-0382-422975 e-mail: emdip07@unipv.it
indirizzo web: <http://chifar.unipv.eu/site/home.html>
Sezione di Chimica e Tecnologia Farmaceutiche - Viale Taramelli 12 –27100 PAVIA
Sezione di Farmacologia - Viale Taramelli 14 –27100 PAVIA

Metodo HPLC - ESI-MS.

La determinazione dell'ipericina è stata condotta mediante il metodo di Camas et al. (Scientific World Journal. 2012; 2012:501027. doi: 10.1100/2012/501027. *Secondary metabolites of Hypericum leptophyllum Hochst., an endemic Turkish species*. Camas N, Radusiene J, Stanius Z, Caliskan O, Cirak C.) con alcune modifiche:

- Sistema HPLC-ESI-MS Thermo Electron Corporation costituito da: pompa quaternaria, auto-campionatore con termostato dotato di loop di iniezione da 10 µl, termostato per colonna. Il sistema cromatografico è interfacciato con uno spettrometro di massa a trappola ionica Finningan™ LCQ Advantage (Thermo Electron Corporation) mediante sorgente di ionizzazione electrospray (ESI).
- Fase stazionaria: ZORBAX SB C18 150x4,6 mm - 5 µm (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany);
- Fase mobile: acetonitrile allo 0,1% di acido formico (isocratica);
- Velocità di flusso: 0,3 ml/min;
- Temperatura della colonna: 40°C;
- Durata analisi: 30 minuti;
- Rivelatore MS impostato in modalità Full Scan, Data Dependent, Selective Ion Monitoring (SIM) e MS² per l'acquisizione del segnale in modalità negativa. Lo ione monitorato ai fini dell'analisi quali- quantitativa è m/z 503.
- Ionization voltage: 3,5KV
- Sheath gas flow rate: 14,31 (unità arbitrarie)
- Auxiliary/gas flow rate: 4,30 (unità arbitrarie)
- Lo ione parent m/z 503 dell'ipericina è stato frammentato con una energia di collisione pari a 55%
- Temperatura del capillare: 200°C
- Per il controllo del sistema e l'analisi dei dati è stato impiegato il software Xcalibur.

In base agli accordi con l' Azienda "Dott. Stefano Faralli scarl", lo studio in oggetto doveva essere condotto mediante tecnica HPLC-DAD (non è stata commissionata l'esecuzione della validazione del metodo). Tuttavia poiché la determinazione dell'ipericina non risultava possibile mediante analisi HPLC-DAD, si è proceduto alla determinazione di tale analita mediante HPLC-ESI-MS.

Analisi HPLC-DAD

La studio è stato condotto nel seguente modo:

- 1) acquisto degli standard di ipericina e iperforina;
- 2) messa a punto di un metodo riportato in letteratura che permetta di determinare ipericina e iperforina nell'estratto di iperico oggetto di studio con mediante tecnica HPLC-DAD;
- 3) analisi del campione.

Dall'analisi dell'iperforina standard si evince che nello standard sono presenti due composti con tempo di ritenzione (RT) pari a 3, 630 e 3,932 min aventi lo stesso spettro UV-Vis riportato in letteratura per l'iperforina e l'adiperforina (Farmaco. 2001. 56 (5-7): 491-6. Comparative evaluation of St. John's wort from different Italian regions. Pietta P, Gardana C, Pietta A.).

I risultati dell'analisi HPLC-DAD condotta sull'estratto di iperico tal quale hanno indicato che il contenuto di ipericina era inferiore al limit of detection (LOD) mentre era presente un picco con RT pari a 3,652 min e con spettro uguale a quello registrato per iperforina o adiperforina. Diversamente non risultava presente il picco a RT pari a 3,932. Da tali risultati si evince che nell'estratto risulta presente solo uno dei due isomeri.

Allo scopo di determinare ipericina e iperforina, si è quindi proceduto a estrazione con solvente organico e concentrazione dell'estratto, nelle seguenti condizioni:

10 ml di estratto di iperico sono stati estratti per tre volte con 10 ml di acetato di etile. L'estratto organico è stato portato a secco al rotavapor (pressione 30 mbar; temperatura 25°C, al riparo dalla luce) e ripreso con 1 ml di CH₃CN (acidificato allo 0,1% di HCOOH), ottenendo così un estratto concentrato 10→1.

L'analisi HPLC-DAD dell'estratto di iperico concentrato ha permesso di identificare l'iperforina sulla base del confronto dei tempi di ritenzione (RT) e degli spettri UV-Vis del composto standard e del corrispondente analita presente nell'estratto. Per l'ipericina, essa non risultava ancora rilevabile.

Si è pertanto proceduto al dosaggio dell'iperforina mediante il metodo delle aggiunte di quantità note di iperforina standard (corrispondenti a +50% e 100% della concentrazione iniziale dell'analita nel campione). A seguito viene riportato il cromatogramma registrato a $\lambda=270$ nm e lo spettro di assorbimento (registrato nell'intervallo 200-600 nm) dell'iperforina standard (Figura 1) e dell'estratto di iperico 10 volte concentrato (Figura 2).

Il contenuto di iperforina nell'estratto 10 volte concentrato è risultato essere 44,20 $\mu\text{g/ml}$, pertanto **il contenuto di iperforina nell'estratto di iperico fornito dalla Azienda "Dott. Stefano Faralli scarl" è 4,42 $\mu\text{g/ml}$.**

Analisi HPLC-ESI-MS

Poiché non è stato possibile isolare e identificare l'ipericina mediante metodo HPLC-DAD, lo studio è proseguito mediante analisi del campione in oggetto con tecnica HPLC-ESI-MS. L'analisi dell'estratto concentrato ottenuto come sopra riportato ha permesso di identificare l'ipericina grazie al confronto del valore di m/z dello ione parent dell'ipericina standard e degli ioni frammento (ottenuti dalla frammentazione dello ione parent), con quelli presenti nell'estratto concentrato di ipericina.

Si è pertanto proceduto al dosaggio dell'ipericina mediante il metodo delle aggiunte di quantità note di ipericina standard (corrispondenti a +50% e 100% della concentrazione iniziale dell'analita nel campione). A seguito viene riportato il cromatogramma, gli spettri di massa dell'ipericina standard e dell'estratto di iperico concentrato (Figura 3 e Figura 4).

Il contenuto di ipericina nell'estratto 10 volte concentrato è risultato essere 9,68 $\mu\text{g/ml}$, pertanto **il contenuto di ipericina nell'estratto di iperico fornito dalla Azienda "Dott. Stefano Faralli scarl" è 0,97 $\mu\text{g/ml}$.**



Dipartimento di Scienze del Farmaco – sede amministrativa Viale Taramelli 12 –27100 PAVIA

Tel. +39-0382-987358-7362 Fax +39-0382-422975 e-mail: emdip07@unipv.it

indirizzo web: <http://chifar.unipv.eu/site/home.html>

Sezione di Chimica e Tecnologia Farmaceutiche - Viale Taramelli 12 –27100 PAVIA

Sezione di Farmacologia - Viale Taramelli 14 –27100 PAVIA

Scheda tecnica dell'estratto di iperico fornito dalla Azienda "Dott. Stefano Faralli scarl".



Laboratorio
Dott. Stefano Faralli scarl

IPERICO **TINTURA MADRE**

CERTIFICATO DI ANALISI E SCHEDA TECNICA **CONFORMITA' A FARMACOPEA EUROPEA 7.4** **CON METODICA ESTRATTIVA NAVIGLIO**

<u>SPECIFICHE</u>	<u>IDENTIFICAZIONE:</u>	<u>RISULTATI</u>
Denominazione	<i>Hypericum perforatum L.</i>	
Materia prima	TINTURA MADRE	
Parte utilizzata	Somma' fiorite	
Origine	Italia	
Solvente	Alcool	
 <u>SPECIFICHE</u>		
Aspetto	Liquido chiaro	
Colore	Caratteristico	
Odore	Caratteristico	
Grado alcolico	65% v/v	63° -68°v/v
Residuo secco a 105°C		
Rapporto di estrazione	1/10	
 Metalli pesanti (conforme a Reg. EC 629/2008)		
Piombo	< Max. 3.0 ppm	Max. 3.0 ppm
Cadmio	< Max. 1.0 ppm	Max. 1.0 ppm
Arsenico	< 0,00026 mg/Kg	
 Pesticidi		
Ocratossina A	Conforme	Assenti
Aflatossine B1	< 0,001mg/Kg	
Aflatossine B1,B2,G1,G2	< Max. 5ppb	Max. 5ppb
	< Max. 10ppb	Max. 10ppb
 Analisi microbiologica:		
Conta totale batteri	< 1000 ufc/g	Max. 1000 ufc/g
Lieviti e muffe	< 10 ufc/g	Max. 10 ufc/g
Streptococchi fecali	< 2 ufc/g	Max. 10 ufc/g
Stafilococco aureo	< 2 ufc/g	Max. 10 ufc/g
Rame	0,77 mg/Kg	
Calcio	52,8 mg/Kg	
Ferro	0,50 mg/Kg	
Magnesio	74,7 mg/Kg	
Potassio	720 mg/Kg	
Sodio	3,9 mg/Kg	
Zinco	1,9 mg/Kg	

STOCCAGGIO: Conservare in luogo fresco e asciutto, non congelare, tenere al riparo da luce e calore.

ALLERGENI: Non contiene nessuno degli allergeni citati nella Direttiva 2003/89/CE e successivi aggiornamenti.

OGM (In accordo con Reg. 1829/2003 e N° 1830/2003): Non contiene, non deriva e non è costituito da organismi geneticamente modificati.

Codice prodotto **LOTTO : SF1769DTG023**
Codice documento: **MC-023SP**
Prima emissione : **07/11/'12 SCADENZA 11/2017**

Dott. STEFANO FARALLI scarl.
P.le Luigi CADORNA, 9
20123 MILANO (MI)
P.I. 06749480965

RESPONSABILE CONTROLLO QUALITA': DOTT. STEFANO FARALLI

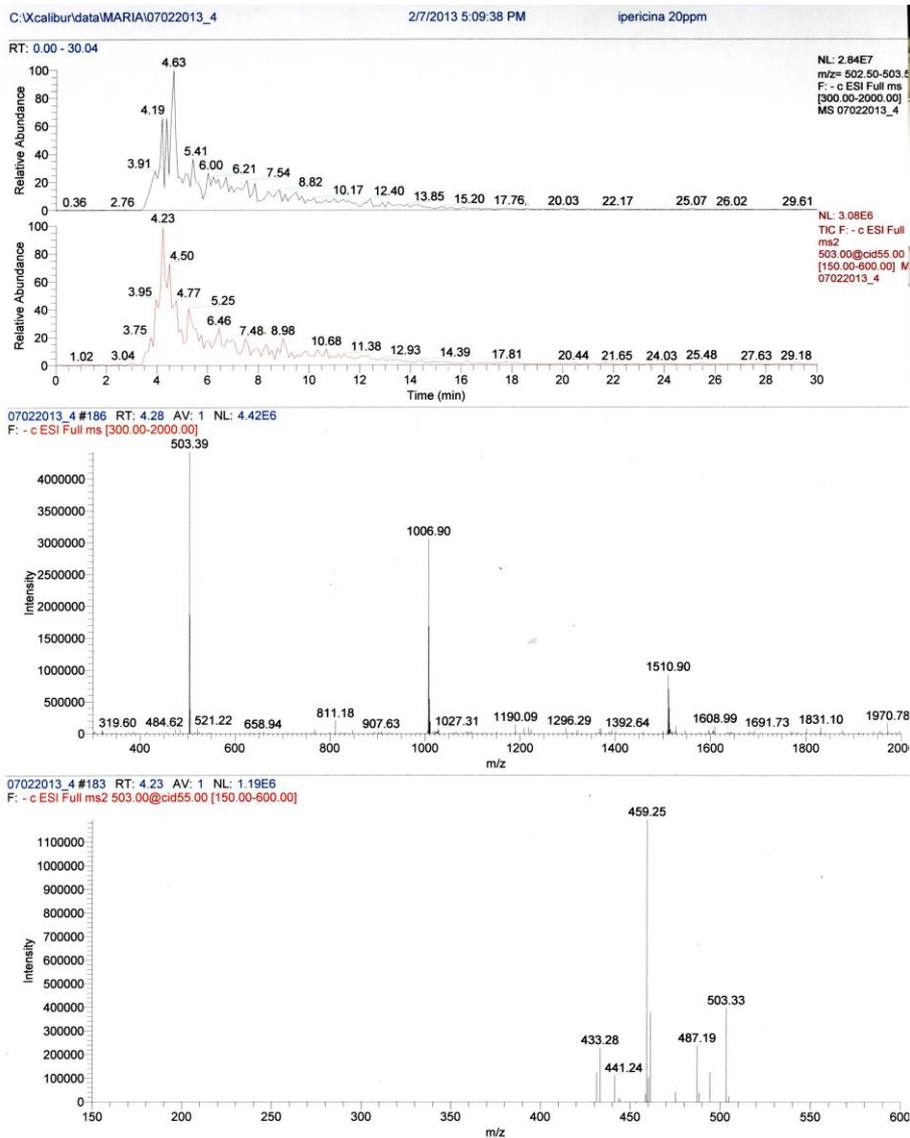


Figura 3. TIC (total ion chromatogram) registrato con modalità Full Scan, Selective Ion Monitoring (SIM) e MS² dell'ipericina standard e relativi spettri MS e MS²

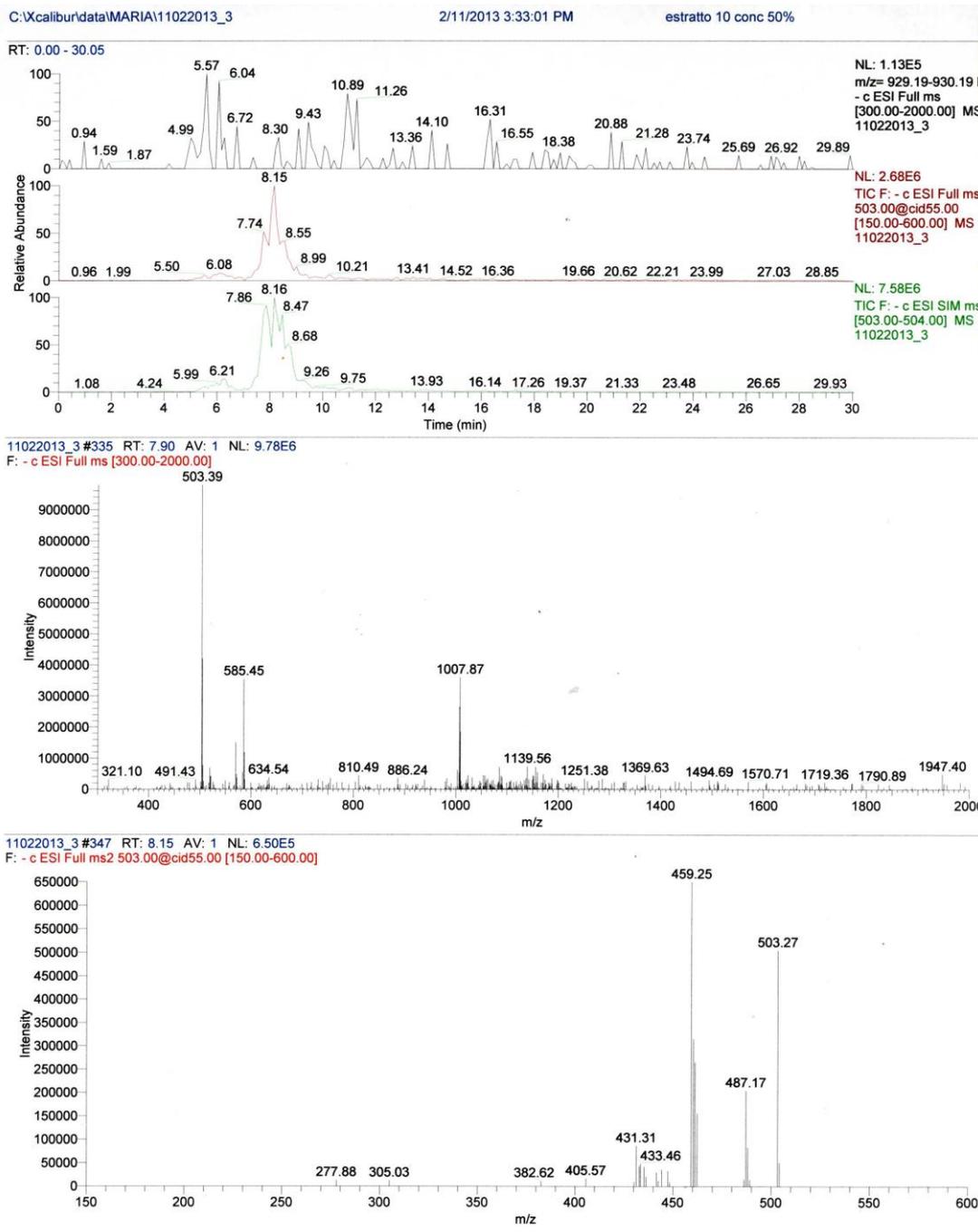


Figura 4. TIC registrato con modalità Full Scan, Selective Ion Monitoring (SIM) e MS2 dell'estratto di iperico concentrato 10x e relativi spettri MS e MS².