

**OPTIMIZACIJA SISTEMA ZA RAZDVAJANJE FLAVONOIDA BILJNE
VRSTE *Hypericum perforatum* L. ssp. *angustifolium*
(KANTARION) METODOM TLC**

Andrija Šmelcerović¹, Siniša Đorđević¹, Branislav Gudžić², Dragan Veličković²

¹*Tehnološki fakultet u Leskovacu, Univerzitet u Nišu*

²*DD"Zdravlje" Farmaceutsko-hemijska industrija Leskovac*

Proceeding of 6th Symposium on Flora of the Southeastern Serbia, Sokobanja, 2000: 177-179.

Separation of flavonoides from the plant species *Hypericum perforatum* L. ssp. *angustifolium* and their identification were carried out using thin layer chromatography. Several mobile phases were used: toluene:methanol=9:1 (v/v) (system 1); toluene:methanol=8:2 (v/v) (system 2); toluene:methanol:chloroform=7:2:2 (v/v) (system 3); chloroform:methanol=9:1 (v/v) (system 4); toluene:methanol:tertiary butyl alcohol=7:2:1 (v/v) (system 5) and toluene:methanol:isobutyl alcohol=7:2:1 (v/v) (system 6). We examined: petroleum etheric, ethyl acetic, acetonic and methanolic extracts of *Hypericum perforatum* L.

The best separation was attained with acetonic and methanolic extracts, using mobile phases: toluene: methanol: chloroform=7:2:2 (v/v) (system 3) and toluene:methanol: tertiary butyl alcohol=7:2:1 (v/v) (system 5). The cited sytems are not referd in literature. The method used, detected in UV ($\lambda = 254$ nm and $\lambda = 366$ nm) and VIS - light, 11, that is 9 components (respectively), from which, on the basis of comparison with Rf standars, three flavonoids were identified in both systems: hyperoside ($Rf_3=0,1$; $Rf_5 = 0,18$), rutin ($Rf_3 = 0,06$; $Rf_5 = 0,12$) and quercetin ($Rf_3 = 0,29$; $Rf_5 = 0,66$).

UVOD

Flavonoidi predstavljaju sekundarne metabolite koji se sintetišu u vaskularnim biljkama kao odgovor na različite ekološke stimulanse. Jedna od funkcija flavonoida je zaštita biljaka od potencijalne štetne UV radijacije (Kootstra, 1994). Utvrđeno je da se flavonoidi u biološkim sistemima mogu ponašati kao antioksidansi, enzimski

inhibitori, fotosenzibilizatori u prenosu energije, respiratori u biosintezi, a takođe imaju estrogene i antikancerogene osobine (Grujić-Injac, Lajšić, 1983).

Ime "flavonoidi" potiče od Kostareckog koji je 1898. godine objavio prve radove o izolovanju hrizina, jedinjenja iz grupe flavona (Grujić-Injac, Lajšić, 1983). Do sada je izolovano preko 5000 flavonoida (Marin, 1998).

Biljne vrste roda *Hypericum* L. odavno su poznate kao lekovite. Najpoznatija vrsta ovog roda je *Hypericum perforatum* L. Najčešće se kao nosilac lekovitih svojstava ove biljne vrste navodi hipericin. Međutim, izuzetno je značajan sadržaj hiperforina i flavonoida.

Cilj ovog rada je optimizacija sistema za razdvajanje flavonoida u ekstraktima biljne vrste *Hypericum perforatum* L. ssp. *angustifolium* (kantaron) metodom tankoslojne hromatografije, ali istovremeno i optimizacija rastvarača za ekstrakciju biljne droge (herba), kao i kapaciteta hromatograma, radi identifikacije i eventualnog preparativnog dobijanja pojedinih flavonoida.

MATERIJALI I METODE

Za ispitivanja u ovom radu je korišćen kantaron *Hypericum perforatum* L. ssp. *angustifolium*, sakupljen na lokalitetu Sobina (okolina Vranja, Južna Srbija, Jugoslavija). Biljni materijal je osušen na sobnoj temperaturi u tankom sloju, a zatim samleven na električnom mlinu i prosejan kroz sito sa otvorima 1 mm.

Kao mobilne faze za TLC hromatografiju korišćeni su različiti sistemi rastvarača. Upotrebljeni rastvarači (toluol, metanol, hloroform, tercijerni butanol i izo butanol) su p.a. kvaliteta.

Kao standardna faza za TLC hromatografiju korišćene su ploče DC- Fertigplatten RP-18 F_{254s} (10x20 cm) firme Merck, sa slojem silikagela debljine 0,25 mm.

Ekstrakcija je vršena postupkom maceracije, za vreme od 24 h. Za pripremu ekstrakata je korišćen odnos biljni materijal : rastvarač = 1 : 10. Kao ekstragensi su korišćeni: petroletar, etil acetat, aceton i metanol (svi p.a. kvaliteta).

Dobijeni hromatogrami su posmatrani pod UV svetlom na $\lambda = 254$ nm i $\lambda = 366$ nm, u cilju identifikacije flavonoidnih komponenti.

REZULTATI I DISKUSIJA

Razdvajanje flavonoida biljne vrste *Hypericum perforatum* L. ssp. *angustifolium* i njihova identifikacija, je vršena metodom tankoslojne hromatografije. Upotrebljeno je više mobilnih faza: toluol : metanol = 9 : 1 (v/v) (sistem 1); toluol :

metanol = 8 : 2 (v/v) (sistem 2); toluol : metanol : hloroform = 7 : 2 : 2 (v/v) (sistem 3); hloroform : metanol=9:1 (v/v) (sistem 4); toluol : metanol: tercijarni butanol=7:2:1 (v/v) (sistem 5) i toluol : metanol : izo butanol = 7 : 2 : 1 (v/v) (sistem 6). Ispitivani su: petroletarski, etil acetatni, acetonski i metanolni ekstrakt *Hypericum perforatum* L.

Najbolje razdvajanje se postiže kod acetonskih i metanolnih ekstrakata, primenom mobilnih faza: toluol : metanol : hloroform = 7 : 2 : 2 (v/v) (sistem 3) i toluol : metanol : tercijarni butanol = 7 : 2 : 1 (v/v) (sistem 5). Navedeni sistemi nisu referisani u literaturi. Primenjenom metodom detektovano je u UV ($\lambda = 254$ nm and $\lambda = 366$ nm) i VIS - svetlosti 11 odnosno 9 komponenata (respektivno) od kojih su, na osnovu upoređivanja sa R_f vrednostima standarda, indentifikovana tri flavonoida u oba sistema: hiperozid ($R_{f3} = 0,1$; $R_{f5} = 0,18$), rutin ($R_{f3} = 0,06$; $R_{f5} = 0,12$) i kvercetin ($R_{f3} = 0,29$; $R_{f5} = 0,66$).

Mali kapacitet hromatograma, do 15 ml ekstrakta onemogućava, hromatografisanje većih količina ekstrakata, pa je ova metoda pogodna samo za indentifikaciju prisutnih flavonoida.

ZAKLJUČAK

Ispitivanjem više mobilnih faza za TLC razdvajanje flavonoida biljne vrste *Hypericum perforatum* L. ssp. *angustifolium*, ustanovljeno je da su najpogodniji sistemi rastvarača: toluol : metanol : hloroform=7:2:2 (v/v) (sistem 3) i toluol : metanol:tercijarni butanol=7:2:1 (v/v) (sistem 5). U navedenim sistemima detektovano je 11 odnosno 9 komponenata, respektivno.

Najbolje razdvajanje se postiže kod acetonskih i metanolskih ekstrakata. Na osnovu upoređivanja sa R_f vrednostima standarda, indentifikovana su tri flavonoida (u oba sistema): hiperozid ($R_{f3} = 0,1$; $R_{f5} = 0,18$), rutin ($R_{f3} = 0,06$; $R_{f5} = 0,12$) i kvercetin ($R_{f3} = 0,29$; $R_{f5} = 0,66$).

LITERATURA

1. Grujić – Injac, B., Lajšić, S., 1983: Hemija prirodnih proizvoda, Univerzitet u Nišu. Niš.
2. Kootstra, A., 1994: Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoides. *Plant Molecular Biology*, 26: 771-774.
3. Marin, D.P., 1998: Biološki aktivne materije viših biljaka, gljiva, algi i bakterija, (D. Stevanović (ed.)). Univerzitet u Novom Sadu. Novi Sad

