

# Istraživanje antracenskih derivata hrvatskih vrsta roda *Rhamnus* tankoslojnom kromatografijom\*

ZITA GAŠPAR RANDIĆ<sup>1</sup>, ŽELJAN MALEŠ<sup>2</sup>, DARIO KREMER<sup>2</sup>, MARKO RANDIĆ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>JADRAN Galenski laboratorij d.d., Pulac bb, Rijeka, <sup>2</sup>Zavod za farmaceutsku botaniku s Farmaceutskim botaničkim vrtom »Fran Kušan« Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Schrottova 39, Zagreb, <sup>3</sup>Javna ustanova »Priroda«, Grivica 4, Rijeka

## TLC analysis of anthracene derivates in Croatian *Rhamnus* species

*Abstract* – The genus *Rhamnus* L. contains 10 species growing in Croatia. *Frangulae cortex* (species *R. frangula* L.) contains a mixture of anthracene derivates, flavonoids, tannins and peptide alkaloids. This herbal drug is used for centuries as a laxative. Barks of nine *Rhamnus* species [*R. alaternus* L., *R. cathartica* L., *R. fallax* Boiss., *R. frangula* L. (= *Frangula alnus* Mill.), *R. intermedia* Steud. & Hochst., *R. orbiculata* Bornm., *R. pumila* Turra, *R. rupestris* Scop. (= *Frangula rupestris* (Scop.) Schur), *R. saxatilis* Jacq.] were collected at the different locations in Croatia and investigated in comparison with *Frangulae cortex* from commercial origin. Thin-layer chromatographic separation of anthracene derivates indicated the presence of glucofrangulins, rein, barbaloin, frangulins and danthron only in the species *R. frangula* and *R. fallax*, while the species *R. alaternus* and *R. pumila* contained danthron.

(<sup>1</sup>JADRAN Galenic Laboratory Ltd., Pulac bb, 51000 Rijeka, Croatia, <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Botany with Pharmaceutical Botanical Garden »Fran Kušan«, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia, <sup>3</sup>Public institution »Priroda«, Grivica 4, 51000 Rijeka, Croatia)

## UVOD

Rod *Rhamnus* L. (krkavina) zastupljen je u Hrvatskoj s deset vrsta (1). Oficinalna biljna droga *Frangulae cortex* (vrsta *R. frangula* L.) (slike 1. i 2.) sadrži biološki aktivne spojeve, mješavinu antrakinonskih derivata (slika 3.), flavonoida, trjeslovina i alkaloida te se primjenjuje stoljećima kao laksativ (2). Kao i ostale biljne droge s antracenskim glikozidima,

\* Rad je prikazan kao poster u okviru tematske cjeline »Fitofarmacija« na Četvrtom hrvatskom kongresu farmacije s međunarodnim sudjelovanjem (Opatija, 27.–30.5.2010.)

laksativno se djelovanje postiže stimulacijom peristaltike, povećanom sekrecijom vode u lumen crijeva, kao i prevencijom reapsorpcije te vode u debelom crijevu (3).



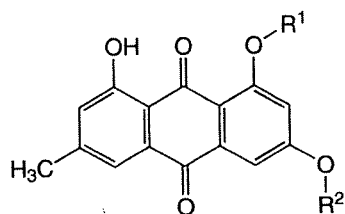
Slika 1. *Rhamnus frangula* L.



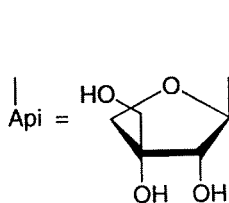
Slika 2. Frangulae cortex

Kvantitativnom analizom utvrđeno je da kore hrvatskih vrsta roda *Rhamnus* sadrže glukofranguline, flavonoide, fenolne kiseline i trjeslovine (4).

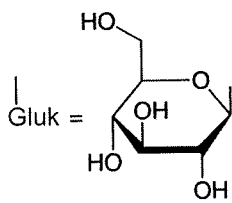
U ovom istraživanju skupljena je kora devet vrsta roda *Rhamnus* [*R. alaternus* L., *R. cathartica* L., *R. fallax* Boiss., *R. frangula* L. (= *Frangula alnus* Mill.), *R. intermedia* Steud. & Hochst., *R. orbiculata* Bornm., *R. pumila* Turra, *R. rupestris* Scop. (= *Frangula rupestris* (Scop.) Schur), *R. saxatilis* Jacq.] na različitim lokalitetima u Hrvatskoj te kvalitativno ispitana zajedno s uzorkom komercijalne biljne droge.



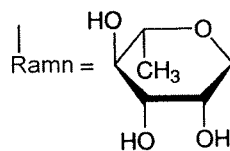
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
frangula emodin	H	H
frangulin A	H	Ramn
glukofrangulin A	Gluk	Ramn
frangulin B	H	Api
glukofrangulin B	Gluk	Api



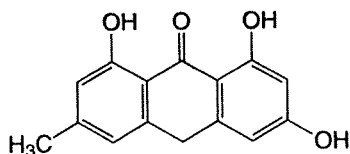
D-*apio*-β-D-furanozil



β-D-glukopiranozil



6-deoksi-α-L-manopiranozil



frangula emodin antron

Slika 3. Aktivne sastavnice droge *Frangulae cortex*

## EKSPERIMENTALNI DIO

### Materijal za istraživanje

Biljni materijal rabljen za istraživanje činili su uzorci kore devet vrsta roda *Rhamnus* pripremljeni sušenjem u jednom sloju na zraku na sobnoj temperaturi i zaštićeni od izravne sunčeve svjetlosti (tablica 1.).

### Identifikacija biljnog materijala

Identitet istraživanih biljnih vrsta i utvrđivanje morfoloških obilježja obavljen je u Zavodu za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu ispitivanjem vanjske i unutarnje građe skupljenih uzoraka.

Tablica 1. Podaci o istraživanim uzorcima i standardima

Oznaka uzorka	Biljna vrsta	Hrvatski naziv vrste	Nalazište	Datum skupljanja
C	<i>R. frangula</i>	krkavina	Komercijalni uzorak	2006.
1	<i>R. frangula</i>	krkavina	Farm. bot. vrt (Zagreb)	29.07.2008.
1a	<i>R. frangula</i>	krkavina	Lonjsko polje	02.09.2008.
1b	<i>R. frangula</i>	krkavina	Rječina (Kukuljani)	15.10.2008.
2	<i>R. cathartica</i>	pasjakovina	Farm. bot. vrt (Zagreb)	29.07.2008.
3	<i>R. fallax</i>	žestika	Veliki Kozjak	26.07.2008.
4	<i>R. rupestris</i>	kamenjarska krkavinka	Vaganac (Velebit)	20.06.2008.
5	<i>R. saxatilis</i>	kamenjarska krkavina	Vaganac (Velebit)	20.06.2008.
6	<i>R. orbiculata</i>	okruglolisna krkavina	Sniježnica (Konavli)	25.06.2008.
7	<i>R. alaternus</i>	vazdazelena krkavina	Bivio (Rijeka)	15.10.2008.
8	<i>R. intermedia</i>	srednja krkavina	Sv. Križ (Rijeka)	15.10.2008.
9	<i>R. pumila</i>	patuljasta krkavina	Pakleno (Obruč)	30.05.2009.

Standardi (poredbene tvari):

B Barbaloin (Aloin)

D Dantron (1,8-dihidroksiantrakinon)

R Rein (1,8-dihidroksiantrakinon-3-karboksilna kiselina)

### Metoda istraživanja

Ispitivanje je provedeno metodom tankoslojne kromatografije (KTS) predloženom u Ph. Eur. (5) u monografiji oficinalne biljne droge *Frangulae cortex*, pomoću pokretne faze voda : metanol : etilacetat (13:17:100 v/v/v) na tankom sloju silikagela 60 F<sub>254</sub> (20x20 cm, 0,25 mm), Merck.

Svaki je uzorak kore prethodno usitnjen. Ekstrakti su pripremljeni tako da je 0,5 g praškasto usitnjenog uzorka ekstrahirano na vodenoj kupelji do vrenja s 5 mL 70%-tnog (v/v) etanola. Nakon hlađenja i centrifugiranja 5 minuta na 3000 okretaja/minuti, bistri gornji sloj služio je kao otopina za kromatografsko ispitivanje.

Na staklenu je ploču nanoseno po 10 mL svake pripremljene otopine poredbene tvari i ispitivane otopine uzoraka.

### Poredbene tvari

- B – Barbaloin (Aloin), Sigma B-6906: 5 mg otopljeno je u 5 mL mješavine jednakih dijelova etanola i vode
- D – Dantron (1,8-dihidroksiantrakinon), Merck 3069: 5 mg otopljeno je u 5 mL mješavine jednakih dijelova etanola i vode
- R – Rein (1,8-dihidroksiantrakinon-3-karboksilna kiselina), Merck 132: 5 mg otopljeno je u 5 mL mješavine jednakih dijelova etanola i vode

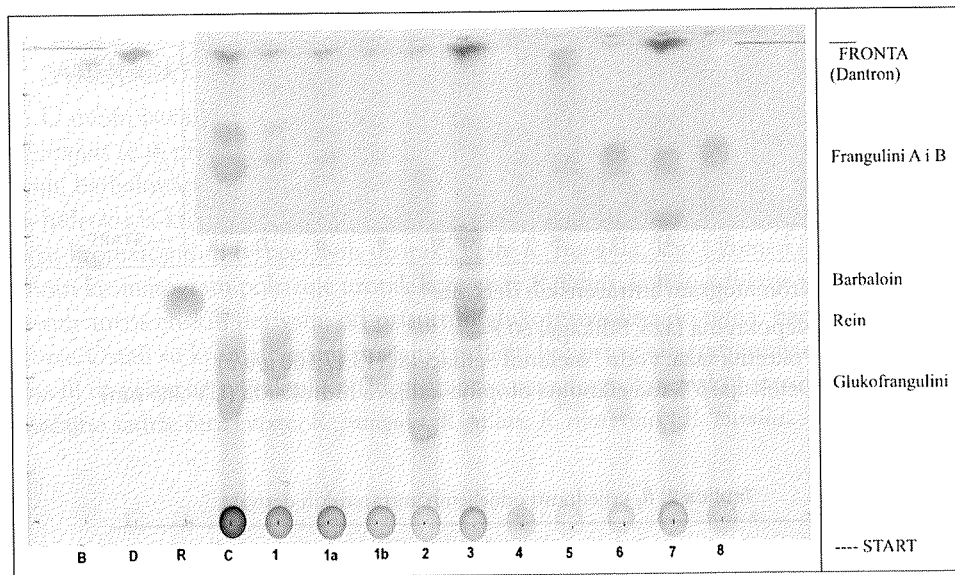
### Detekcija

Ploča se osuši na zraku te nakon 5 minuta prska 5%-tnom otopinom kalijeva hidroksida u 50%-tnom (v/v) etanolu, zagrijava 15 minuta na 100–105 °C i ohladi.

## REZULTATI I RASPRAVA

Svi su uzorci ispitani na prisutnost antracenskih derivata metodom tankoslojne kromatografije. Primijenjeni su etanolni ekstrakti uzoraka te smjesa otapala voda : metanol : etilacetat (13:17:100 v/v/v) kao pokretna faza. Nakon odjeljivanja i sušenja na zraku, slobodni antracenski derivati detektirani su kao intenzivne žute zone. Heterozidi, kao što je i glikozid barbaloin (poredbena tvar), nisu bili uočljivi. Vizualizacija bioaktivnih sastavnica provedena je prskanjem 5%-tnom etanolnom otopinom kalijeva hidroksida. Nakon prskanja i propisanog zagrijavanja, ploče su promatrane na dnevnom svjetlu i pod UV zračenjem valne duljine 365 nm. Uočene su narančaste, žutosmeđe i plave fluorescirajuće mrlje (slike 4.–6.).

Prikazani kromatogrami upućuju na značajne razlike u kemijskom sastavu različitih biljnih vrsta ispitivanih uzoraka. Posebno se ističe kromatografska vrpca žestike, *R. fallax* (uzorak 3) bogatim sastavom antracenskih derivata na svim kromatogramima. Ona je morfološki i anatomski vrlo slična kori krkavine, ali se razlikuju u kemijskom sastavu. Da bi se izbjeglo patvorenje i miješanje tih dviju vrsta, u monografiji vrste *R. frangula* u Ph. Eur. predlaže se dodatna detekcija 0,5%-tnom metanolnom otopinom nitrotetrazolij plavilo klorida i promatranje na dnevnom svjetlu (slika 4.). U donjoj trećini kromatograma ispitivane otopine komercijalnog uzorka (uzorak C), kao i uzoraka vrste *R. frangula* iz Farmaceutskog botaničkog vrta »Fran Kušan« (uzorak 1) te s dvije različite lokacije



Slika 4. Kromatogram antracenskih derivata

Nepokretna faza: Silikagel 60 F<sub>254</sub>

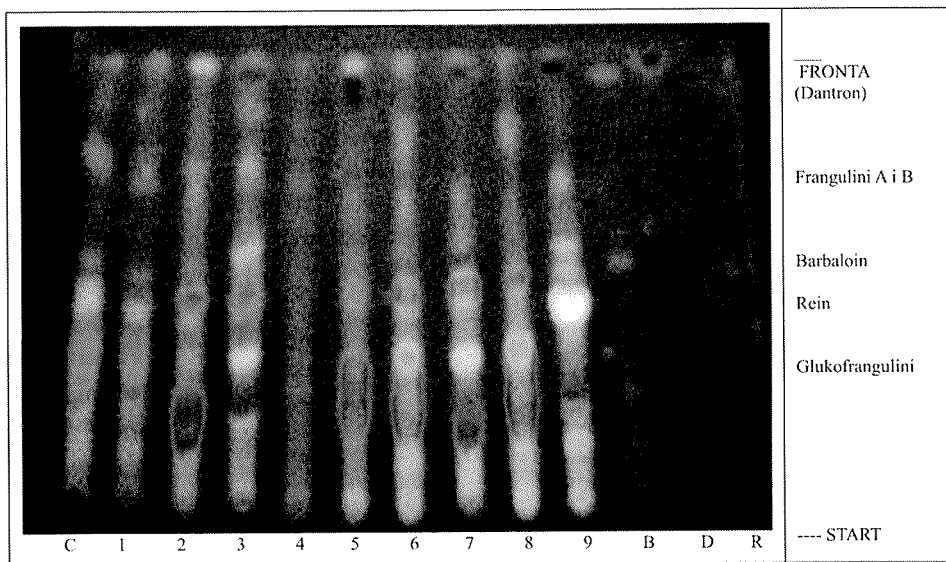
Pokretna faza: voda : metanol : etilacetat (13:17:100 v/v/v)

Detekcija: 5%-tna etanolna otopina kalijeva hidroksida

0,5%-tna metanolna otopina nitrotetrazolij plavilo klorida

(uzorci 1a i 1b) vidljive su dvije do tri žutosmeđe zone (glukofrangulini), a u gornjoj trećini dvije do četiri crvenkaste zone (frangulini), koje nisu uvijek jasno odijeljene.

Promatranjem kromatograma pod UV zračenjem kod 365 nm (slike 5. i 6; tablica 2.) u središnjem dijelu kromatograma poredbene otopine vidljiva je smeđežuta zona koja odgovara barbaloinu. Na kromatogramu ispitivanih otopina vrste *R. frangula* ne pojavljuju se zone intenzivne žute fluorescencije i zone narančaste do crvene fluorescencije, koje bi po položaju odgovarale položaju barbaloina na kromatogramu poredbene otopine. Vidljivo je da vrsta *R. fallax* (uzorak 3) sadrži barbaloin, rein i dantron. Od ostalih ispitivanih vrsta vidljivo je da vrsta *R. alaternus* (uzorak 7), uz izrazitu prisutnost dantrona, pokazuje i prisutnost još nekih antracenskih derivata. Dantron sadrži i vrsta *R. pumila* (uzorak 9)



Slika 5. Kromatogram antracenskih derivata

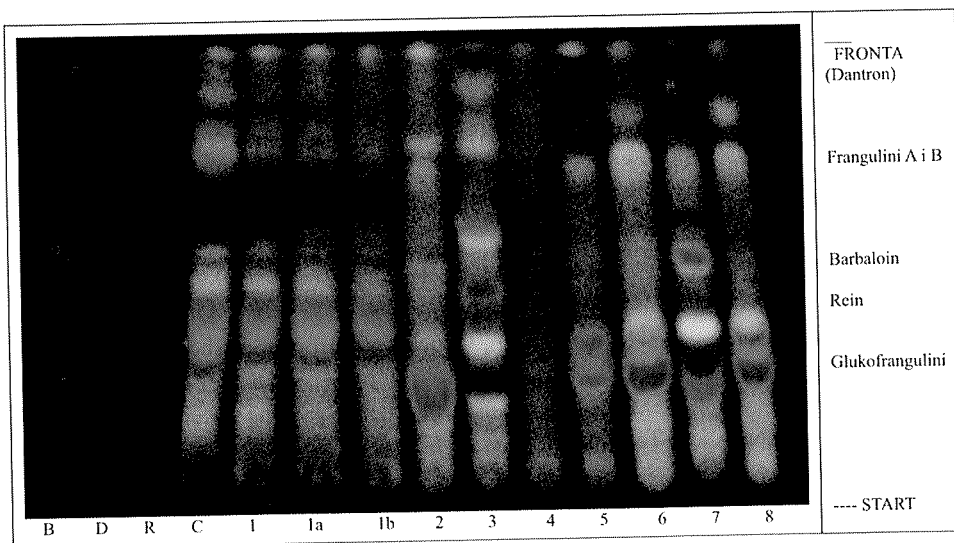
Nepokretna faza: Silikagel 60 F<sub>254</sub>

Pokretna faza: voda : metanol : etilacetat (13:17:100 v/v/v)

Detekcija: 5%-tna etanolna otopina kalijeva hidroksida (UV-365 nm)

Tablica 2. R<sub>F</sub> vrijednosti odijeljenih antracenskih derivata

Boja	Antracenski derivati	R <sub>F</sub>
Crvenosmeda	Dantron (1,8-dihidroksiantrakinon)	1,0 (fronta)
Narančasta	Frangulini A i B (monoglikozidi)	0,80-0,85
Žutosmeda	Barbaloin (Aloin)	0,55
Smeda	Rein	0,45
Narančastosmeda	Glukofrangulini A i B	0,25-0,45



Slika 6. Kromatogram antracenskih derivata

Nepokretna faza: Silikagel 60 F<sub>254</sub>

Pokretna faza: voda : metanol : etilacetat (13:17:100 v/v/v)

Detekcija: 5%-tna etanolna otopina kalijeva hidroksida (UV-365 nm)

## ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju odijeljeni su antracenski derivati u korama devet vrsta roda *Rhamnus* te je provedena identifikacija svih uzoraka usporedbom sa standardima reina, barbaloinom i dantronom. Nakon detekcije 5%-tnom etanolnom otopinom kalijeva hidroksida kromatografske su ploče promatrane pod UV-365 nm te su uočeni identični kromatogrami (vrpce) svih uzoraka vrste *R. frangula*, kao i komercijalnog uzorka. Sličan kromatogram pokazuje uzorak kore vrste *R. fallax*, koji se odlikuje raznolikim sastavom antracenskih derivata, od prisutnih glukofrangulina do reina, barbaloina i dantrona. Ostali su kromatogrami značajno različiti bez prisutnih frangulina i glukofrangulina ili uz prisutne svijetloplave fluorescentne zone (naftokinonski heterozidi). Dantron značajno sadrže četiri vrste: *R. frangula*, *R. fallax*, *R. alaternus* i *R. pumila*.

### Literatura – References

1. R. Domac, Flora Hrvatske – priručnik za određivanje bilja (II. Izdanje), Školska knjiga, Zagreb 2002, 158.
2. M. Wichtl, Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Medpharm Scientific Publishers, London 1994, 208.
3. [http://www.who.int/medicines/library/trm/medicinalplants/monograph\\_volume\\_two.sht](http://www.who.int/medicines/library/trm/medicinalplants/monograph_volume_two.sht), datum pristupa 1.6.2010.
4. Ž. Maleš, D. Kremer, Z. Gašpar Randić, M. Randić, K. Hazler Pilepić, M. Bojić, Acta Biol. Crac. Ser. Bot. **52** (2010) – prihvaćen za tisak.
5. European Pharmacopoeia, 6<sup>th</sup> Edition, Council of Europe, Strasbourg 2008, 1949.
6. H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski, Plant Drug Analysis, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg-New York-Tokyo 1984, 296.

Primljeno 14. lipnja 2010.