

DUŠANKA MIHAJLOVIĆ
VESNA NOVKOVIĆ
VLADIMIR BANKOVIĆ

Centar za istraživanje i razvoj,
FHI Zdravlje Actavis Company,
Leskovac

NAUČNI RAD

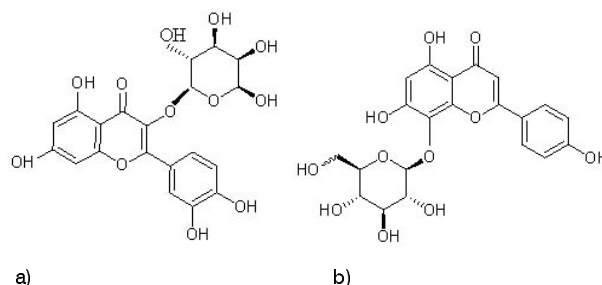
582.734.3+543.4/.5:615.221/.222

ODREĐIVANJE HIPEROZIDA U CVETU I LISTU GLOGA (*CRATAEGUS OXYCANTHA* I *CRATAEGUS MONOGYNA*) PRIMENOM METODE SPEKTROFOTOMETRIJE

Cvet i list gloga sadrže veliki broj aktivnih komponentata, koje imaju široku primenu u proizvodnji farmaceutskih preparata iz grupe kardiotonika, antihipertonička, antihipotonika, arteriosklerotika antiaritmika i antianemika. Antihipertonični efekat gloga potiče od hiperozida. Zbog lekovitog delovanja hiperozida i drugih flavonoida iz gloga njegovo određivanje ima veliki značaj za ocenu kvaliteta ekstrakta i preparata. Ekstrakcija flavonoida iz lista i cveta gloga (*C. oxycantha* i *C. monogyna*) vršena je sa 40 %-tnim i 70 %-tnim etanolom, postupkom perkolacije, a suvi ekstrakt je dobijen prečišćavanjem tečnog ekstrakta gloga sa etilacetatom i etanolom. Za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida obračunatih kao hiperozid, primenjen je spektrofotometrijski metod, zasnovan na merenju apsorbanacija na 425 nm.

Cvet gloga (*C. oxycantha* i *C. monogyna*) sadrži veliki broj bioaktivnih komponenti koje imaju kardiotonično, antihipertonično, antihipotonično, antiaritmično, antioksidativno i antianemično delovanje [1–11]. Primarni nosioci srčanoaktivnog dejstva su bioflavonoidi gloga [5,8,11]. Najvažniji flavonoidi nađeni u glogu su: kvercetin, hiperozid, viteksin, viteksin-4'-L-ramnozid, viteksin-4'-L-ramno-D-glukozid, viteksin-4'-7-di-D-glukozid, rutin, kvercetin-3-ramno-galaktozid [5]. Glog sadrži još i oligomer procianidin, triterpenske kiseline i aromatične amine [5]. Opsežna klinička ispitivanja preparata na bazi ekstrakata gloga pokazala su delovanje njihovih sastojaka u slučajevima ranog stadijuma hroničnog popuštanja srca. Ekstrakt gloga poboljšava prokrvljenost srčanog mišića, povećava njegovu snagu i provodljivost, a deluje i kao antioksidans [6–11]. Kardiotonično delovanje ekstrakta gloga potiče u najvećoj meri od flavonoida u prvom redu hiperozida i viteksina [5–11] (slika 1).

Zbog toga određivanje sadržaja hiperozida i drugih flavonoida u ekstraktima, ima veliki značaj za ocenu kvaliteta ekstrakta i preparata. U literaturi ima podataka o metodama identifikacije tankoslojnom hromatografijom i UV-spektrofotometrijom, kao i određivanju sadržaja flavonoida u *C. oxycantha* [10], ali nisu nađeni podaci za određivanje sadržaja u ekstraktima iz mešavine cveta i lišća *C. oxycantha* i *C. monogyna*, koji se koriste u farmaceutskoj industriji. U ovom radu izvršena su ispitivanja u cilju razvoja pouzdanih originalnih metoda za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida u ekstraktima iz



Slika 1. Strukturne formule hiperozida i viteksina
Figure 1. Structural formula of hyperoside and vitexin

mešavine cveta i lista ove dve vrste gloga, uključujući metode ekstrakcije i pripreme rastvora za određivanje i identifikaciju UV-spektrofotometrijski i tankoslojnom hromatografijom (TLC).

EKSPERIMENTALNI DEO

Biljni materijal

Korišćena je komercijalna mešavina cveta i lista dve vrste gloga (*C. oxycantha* i *C. monogyna*) nabavljena 2004. godine, grubo usitnjena na mlinu ALPINA i dodatno usitnjena u električnom mlinu za kafu. Kvalitet droge odgovara zahtevima koji su navedeni u literaturi [6]. Spektrofotometrijska merenja su vršena na aparatu "Perkin-Elmer Lambda 15 UV/VIS Spektrophotometer".

Standardne supstance

Hiperozid i rutin (Merck).

Hemikalije

Sve korišćene hemikalije su stepena čistoće p.a. (Merck).

* Rad je saopšten na VI simpozijumu "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Leskovac 21–22. oktobar 2005.

Adresa autora: V. Banković, Centar za istraživanje i razvoj, FHI Zdravlje Actavis Company, Vlakova 199, 16000 Leskovac
Rad primljen: Septembar 12, 2005
Rad prihvaćen: Januar 30, 2006

Određivanje sadržaja flavonoida u biljnoj sirovini [10]

600 mg mešavine cveta i lista gloga meša se u balonu od 100 cm³ sa 1 cm³ 0,5%-nog rastvora urotropina (heksametilentetramina), 20 cm³ acetona i 2 cm³ 25%-ne hlorovodonične kiseline i zagreva 30 minuta uz refluks. Smeša se filtrira u odmerni sud od 100 cm³. Ostatak biljne sirovine se ekstrahuje još dva puta po 10 minuta sa po 20 cm³ acetona uz refluks na temperaturi ključanja. Vreli rastvori se filtriraju. Posle hlađenja do sobne temperature, sadržaj odmernog suda se dopuni do oznake dodavanjem acetona. 20 cm³ ovog rastvora pomeša se u levku za odvajanje sa 20 cm³ vode, ekstrahuje jedanput sa 15 cm³ i 3 puta sa po 10 cm³ etilacetata. Spojene faze etilacetata tretiraju se 2 puta sa po 50 cm³ vode, odvoji se organska faza, propušta kroz sloj bezvodnog natrijum-sulfata u odmerni sud od 50 cm³ i dopuni etilacetatom do oznake. 10 cm³ ovog rastvora (rastvor za ispitivanje) meša se sa 1 cm³ reagensa aluminijumhlorida i dopuni 5%-nim rastvorom sirćetne kiseline u metanolu do 25 cm³. Uporedo se 10 cm³ rastvora za ispitivanje razređuje samo sa 5%-nim rastvorom sirćetne kiseline u metanolu do 25 cm³ i koristi kao slepa proba. Posle 30 minuta meri se apsorbcija ispitivanog rastvora na 425 nm. Sadržaj flavonoida se obračunava kao hiperozid po formuli:

$$\% \text{ ukupnih flavonoida} = (A/A_1) \times R/m$$

gde je:

A – apsorbcija ispitivanog rastvora na 425 nm;

A₁ – apsorbcija 1% m/m rastvora standardne supstance na 425 nm (500)

R – razblaženje polaznog ekstrakta (625)

m – masa uzorka u gr

Priprema tečnih ekstrakata

Za pripremu tečnih alkoholnih ekstrakata korišćen je originalni metod perkolacije sa 70%-nim (v/v) i 40%-nim (v/v) etanolnim rastvorima, kao ekstragensima (percolator: L = 60 cm; d = 10 cm; protok: 3 cm³/min; odnos biljna sirovina – perkolat 1:5 m/v). Dobijeni tečni ekstrakti se koncentruju na rotacionom vacuum-uparivaču ("Devarot", Ljubljana) do odnosa 1:1 (m/v), koncentrovani ekstrakt ekstrahuje etilacetatom (1x500 cm³ i 2x250 cm³) i sjedinjeni etilacetatni ekstrakti upare do suva na rotacionom vacuum-uparivaču. Suvi etilacetatni ekstrakti se rastvaraju u 70%-nom (v/v) ili u 40%-nom (v/v) etanolnom rastvoru, tako da se dobije tečni ekstrakt zapremine koja odgovara odnosu biljne sirovine i odgovarajućeg etanolnog rastvora 1:5 (m/v). Ovako dobijeni tečni ekstrakti se koriste za dalja ispitivanja.

Priprema suvih ekstrakata

Tečni ekstrakt cveta ili lista dobijen po originalnoj proceduri za pripremu tečnog ekstrakta perkolacijom sa

70%-nim (v/v) etanolnim rastvorom, koncentruje se (rotacioni vacuum-uparivač) do 1/5 polazne zapremine, ekstrahuje tri puta etilacetatom (zapremina etilacetata za ekstrakciju odgovara 1/2 polazne zapremine perkolata), spojeni etilacetatni ekstrakti se propuštaju kroz sloj bezvodnog natrijumsulfata, upari etilacetat (rotacioni vacuum-uparivač) i dobijeni ugušćeni ekstrakt suši u vacuum sušnici (60°C) do vlažnosti ispod 5%. Tamnozeleni suvi ekstrakt se sprasi i čuva u dobro zatvorenim, tamnim staklenim bocama zaštićeno od svetlosti i koristi za dalja ispitivanja.

Priprema rastvora za identifikaciju flavonoida

Tečni ekstrakti: 10 cm³ 70%-nog ili 40%-nog (v/v) vodeno etanolnog ekstrakta gloga se upari do suva na vacuum-uparivaču. Suvi ostatak se rastvara u 5 cm³ metanola.

Suvi ekstrakt: 100 mg se rastvara u 10 cm³ metanola.

Rastvori standarda: rastvor hiperozida, koncentracije 0,05% (m/v) i rastvor rutina koncentracije 0,05% (m/v).

Identifikacija flavonoida

Za identifikaciju flavonoida u tečnim ekstraktima gloga primenjen je metod hromatografije na tankom sloju: *stacionarna faza:* silikagel G (Merck); *staklene ploče:* 20x20 cm; *debljina tankog sloja:* 0,25 mm; *mobilna faza:* etilacetat:etilmetilketon:mravlja kiselina:voda 50:30:10:10 (v/v/v/v); *reagens za prskanje:* 1%-ni rastvor (m/v) β-etilamino-estar difenilborne kiseline u metanolu i 5%-ni rastvor (m/v) polietilenglikola 4000 u 96%-nom etanolu [10]. *Applikator za izvlačenje ploča:* DESAGA DC, Heidelberg, Germany. *Izazivanje mrlja na hromatogramu:* zagrevanje 10 minuta u sušnici na 100°C [10]. *Nanošenje rastvora na tanki sloj:* po 50 μl ("Hamilton" – mikropipeta).

Priprema rastvora za određivanje sadržaja flavonoida u ekstraktima

Korišćene su originalne procedure za pripremu ekstrakata.

Tečni ekstrakti. Ekstrakt (5 cm³) prenese se i upari na rotacionom vacuum uparivaču, na temperaturi ne većoj od 60°C. Doda se 1 cm³ 0,5%-nog rastvora urotropina (heksametilentetramina), 20 cm³ acetona, 2 cm³ 25%-ne hlorovodonične kiseline i zagreva 30 minuta pod refluksom. Smeša se filtrira u odmerni sud od 100 cm³. Posle hlađenja na sobnoj temperaturi, sadržaj merenog suda se dopuni do oznake dodavanjem acetona. 20 cm³ ovog rastvora meša se u levku za odvajanje sa 20 cm³ vode, ekstrahuje jedanput sa 15 cm³ i 3 puta sa po 10 cm³ etilacetata. Spojene faze etilacetatnog ekstrakta ispiraju se 2 puta sa po 50 cm³ vode, organska faza se odvoji i propušta kroz sloj bezvodnog natrijumsulfata.

Filtrat se hvata u odmerni sud od 50 cm³ i dopuni etilacetatom do oznake. 10 cm³ ovog rastvora (rastvor za ispitivanje) meša se sa 1 cm³ reagensa aluminijumhlorida i dopuni 5%-nim rastvorom sirćetne kiseline u metanolu do 25 cm³. Uporedo se 10 cm³ rastvora za ispitivanje razređuje samo sa 5%-nim rastvorom sirćetne kiseline u metanolu do 25 cm³ i koristi kao slepa proba. Posle 30 minuta meri se apsorpcija ispitivanog rastvora na 425 nm. Proračun sadržaja flavonoida, obračunava se kao hiperozid (specifična apsorpcija na 425 nm: 500).

Suvi ekstrakt: 100 mg suvog ekstrakta obrađuje se na isti način kao i biljna sirovina, s tim što se ne vrši dvostruka ekstrakcija acetonom.

Priprema rastvora za identifikaciju flavonoida

Tečni ekstrakti. Priprema rastvora vršena je po originalnoj proceduri: 10 cm³ 70%-nog vodeno-etanolnog ekstrakta gloga upari se do suva na vacuum uparivaču. Suvi ostatak se rastvara u 5 cm³ metanola.

10 cm³ 40%-nog vodeno-etanolnog ekstrakta gloga upari se do suva na vacuum uparivaču. Suvi ostatak se rastvara u 5 cm³ metanola.

Suvi ekstrakt: 100 mg se rastvara u 10 cm³ metanola. Kao referentni rastvori korišćeni su rastvori hiperozida koncentracije 0,05% (m/v) i rutina koncentracije 0,05% (m/v).

Identifikacija flavonoida [10].

Hromatogram je razvijen korišćenjem mobilne faze: etilacetat:etilmetilketon:mrvlja kiseline:voda (50:30:10:10, v/v/v/v). Detekcija je vršena pod UV svetlošću ($\lambda = 366$ nm). Izazivanje hromatograma vršeno je 1%-nim rastvorom (m/v) β -etilamino estra difenilborne kiseline u metanolu i 5%-nim (m/v) rastvorom polietilen-

glikola 4000 u 96%-nom etanolu. Nakon izazivanja hromatograma, ploča se zagreva 10 minuta u sušnici na 100°C. Identifikacija flavonoida vrši se preko Rf vrednosti mrlja u ispitivanim ekstraktima u odnosu na Rf vrednosti standardnih rastvora hiperozida i rutina.

Određivanje sadržaja flavonoida u ekstraktima

Korišćene su originalne procedure.

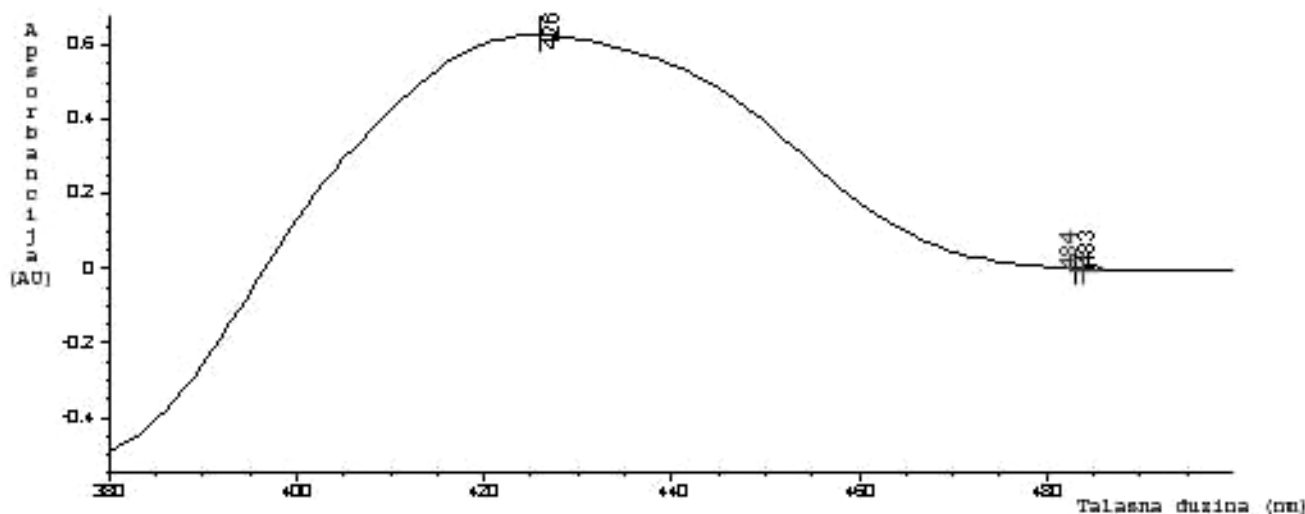
Tečni ekstrakti. Ekstrakt (5 cm³) prenese se u balon od 100 cm³, upari na rotacionom vakuum uparivaču do suva, na temperaturi ne većoj od 60°C. *Dalji postupak je isti kao kod određivanja sadržaja flavonoida u biljnoj sirovini samo bez ponovne dvostruke ekstrakcije.*

Suvi ekstrakt. 100 mg suvog ekstrakta obrađuje se isto kao kod određivanja sadržaja flavonoida u biljnoj sirovini samo bez ponovne dvostruke ekstrakcije.

REZULTATI I DISKUSIJA

Hromatografijom na tankom sloju silikagela G identifikovani su hiperozid i rutin. Analizom dobijenih hromatograma ekstrakata u odnosu na standardne rastvore hiperozida i rutina, potvrđeno je prisustvo hiperozida ($R_f = 0,79$); mrlja intenzivno žuto-braon-narandžaste boje [10] i rutina ($R_f = 0,49$; jaka žuto-braon fluorescencijna mrlja [10]. Ovim je potvrđeno da se propisana standardna procedura [10] za identifikaciju flavonoida u *C. oxycantha* može koristiti i za njihovu identifikaciju u mešavini cveta i lista *C. oxycantha* i *C. monogyna*. Prema tabeli 1. fizičko-hemijske karakteristike mešavine cveta i lista odgovaraju zahtevima propisanim u nemačkoj farmakopeji DAB 10 [10].

Nađeno je da je sadržaj ukupnih flavonoida u drogi 0,483%, u tečnom 40%-nom (v/v) etanolnom ekstraktu 138 mg/100 cm³ i 70%-nom (v/v) etanolnom ekstraktu



Slika 2. UV spektar hiperozida u 70%-nom ekstraktu gloga
Figure 2. UV spectrum of hyperoside in 70% hawthorn extract

Tabela 1. Fiziko-hemijski parametri kvaliteta *C. oxycantha* i *C. monogyna*, cvet i list

Table 1. Physico-chemical quality parameters of *C. oxycantha* and *C. monogyna*, flower and leaf

Redni broj N ^o	Parametar Parameter	Nađeno Find
1.	Izgled Appearance	Odgovara Correspond
2.	Identifikacija Identification	Odgovara Correspond
3.	Vlaga Humidity	12,60%
4.	Pepeo Ash	5,74%
5.	Pepeo nerastvoran u kiselini Ash no solvent in acid	1,28%

Tabela 2. Sadržaj ukupnih flavonoida u tečnim ekstraktima gloga (odnos droga-rastvarač=1:2)

Table 2. Content of total flavonoids in hawthorn liquid extracts (ratio herb-solvent = 1:2)

40%-ni (v/v) ekstrakt 40% (v/v) extract mg/100 cm ³	70%-ni (v/v) ekstrakt 70% (v/v) extract mg/100 cm ³
137,50	157,00
139,00	158,25
139,50	158,75
138,25	157,75
138,00	158,50
137,50	157,75
138,00	157,25
137,50	157,00

Tabela 3. Sadržaj hiperozida u suvom ekstraktu

Table 3. Content of hyperoside in dry extract

% Hiperozida % Hyperoside
9,87
9,84
9,81

157 mg/100 cm³. Sadržaj flavonoida u tečnim ekstraktima je u granicama koje su propisane internim standardima za ove ekstrakte koji se koriste u proizvodnji odgovarajućih fitopreparata (FHI "Zdravlje" Actavis company – Leskovac).

UV – spektar rastvora hiperozida u ekstraktu gloga dat je na slici 2. Maksimum UV apsorpcije (425 nm) odgovara [10].

Potvrđena je reproduktivnost rezultata određivanja sadržaja flavonoida UV – spektrofotometrijskom meto-

dom (tabele 2 i 3), što pokazuje da su primenjene originalne procedure za pripremu ekstrakata i njihovih rastvora za određivanje sadržaja flavonoida u njima pouzdane.

Iz rezultata datih u tabeli 2 i 3 vidi se da primenjeni UV-spektrofotometrijski metod određivanja flavonoida u suvom ekstraktu mešavine cveta i lista gloga, takođe, ima zadovoljavajuću reproduktivnost.

ZAKLJUČAK

Primenom originalne metode perkolacije dobijeni su tečni 40%-ni i 70%-ni vodeno etanolni ekstrakti iz mešavine cveta i lista gloga u kojima su hromatografijom na tankom sloju silikagela G identifikovani flavonoidi hiperozid i rutin. Stepenn ekstrakcije ukupnih flavonoida sa 40%-nim odnosno sa 70%-nim etanolom je 57,14% odnosno 65,01%, respektivno. Prinos ukupnih flavonoida u suvom ekstraktu je 63%.

UV – spektrofotometrijski metod određivanja sadržaja flavonoida u ekstraktima gloga obezbeđuje zadovoljavajuću reproduktivnost rezultata.

Rad je rezultat projekta TR-6708Å koji finansira Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Vlade Repulike Srbije.

LITERATURA

- [1] Racz-Kotilla. Hypotensive and beta-blocking effect of procyanidins of *Crataegus monogyna*. *Planta Med.*, **39** (1980) 239.
- [2] European pharmacopoeia, 3rd ed., Suppl. 2000. Strasbourg, Council of Europe, 2000.
- [3] Wichtl M. *Crataegi folium cum flore*. In: Wichtl. M., Ed. *Teedrogen und Phytopharmaka*, 3rd ed., Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1997.
- [4] Wichtl, M; *Teedrogen*, Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage, Wissenschaftlicher Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, 1989.
- [5] A.Y. Leung, Foster S., *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics*, Second Edition, Wiley Interscience, A John Wiley&Sons, Inc., Publication, 2003.
- [6] T. Bahorun et al., Antioxidant activities of *Crataegus monogyna* ekstrakts. *Planta Med.*, **1994** (1994) 323–328.
- [7] H. Wagner, J. Grevel, *Planta Med.* **45** (1982) 98.
- [8] M. Schussler et al., Cardiac effects of flavonoids from *Crataegus* species. *Planta Med.* **59** (suppl. 2) (1993) A688.
- [9] Jugoslovenska farmakopeja 2000 (Ph.Jug.V), Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja, Savezna administracija, Beograd, 2000.
- [10] *Deutsches Arzneibuch 10 Ausgabe*, Deutsche Apotheker Verlag, Stuttgart, Govi-Verlag GmbH/Eschborn, 1994.
- [11] H.P.T. Ammon, R. Kaul, *Crataegus*, Herz-Kreislauf-Wirkungen von *Crataegus*extrakten, Flavonoiden und Orocyanidinen, Teil 3: Wirkungen auf den Kreislauf, *Deutsche Apotheker Zeitung*, **134** (1994) 2631–2636.

SUMMARY

THE DETERMINATION OF HYPEROSIDE IN THE FLOWER AND LEAF OF HAWTHORN (*CRATAEGUS OXYCANTHA* AND *CRATAEGUS MONOGYNA*) BY THE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD

(Scientific paper)

Dužanka Mihajlović, Vesna Novković, Vladimir Banković, Research and Development Centre, Pharmaceutical and Chemical Industry "Zdravlje" Actavis Company, Leskovac

The flower and leaf of hawthorn contains many active components, used in the production of pharmaceutical preparations for cardiotoxic, anti-hypertonic, anti-hypotonic, arteriosclerotic, anti-arithmetic and anti-anemic groups. According to the ROTTE list (1996), 159 of 1800 pharmaceutical preparations contain components from hawthorn. Due to the remedial action of hyperoside and other flavonoids from hawthorn, their determination is important for the standardization of extract and preparation quality. The extraction of the flavonoids from a mixture of hawthorn (*C. oxycantha* and *C. monogyna*) flower and leaf was carried out by percolation with 40% and 70% (v/v) ethanol. In order to determine the content of total flavonoids calculated as hyperoside, spectrophotometric method with aluminium(III) chloride as a colour reagent at 425 nm was applied. The total flavonoid content in the herbal material mixture was 0.483%, in 40% and 70% (v/v) ethanolic liquid extract it was 138 mg/100 cm³ and 157 mg/100 cm³, respectively. The extraction degree of total flavonoids with 40% and 70% (v/v) ethanolic solutions was 57.14% and 65.01%, respectively. The yield of total flavonoids in the dry extract was 63% in regard to the herbal mixture content.

Ključne reči: Hiperozid • Flavonoidi • Glog • *Crataegus oxycantha* • *Crataegus monogyna* • Cvet • List • Droga • Ekstrakt • Spektrofotometrijska metoda •

Key words: Hyperoside • Flavonoids • Hawthorn • *Crataegus oxycantha* • *Crataegus monogyna* • Flower • Leaf • Herb • Extract • Spectrophotometric method •