

# PROBLEME DE FARMACIE

Laboratorul de farmacognozie al I.M.F. Iași  
(cond.: conf. E. Grigorescu, doctor farmacist)

## STUDIUL CROMATOGRAFIC AL FLAVONELOR DIN SPECIA HIBISCUS TRIONUM L.

E. Grigorescu, M. Lazăr

În vederea valorificării unor produse vegetale dotate cu acțiune diuretică și saluretică, folosite în medicina populară, un colectiv al I.M.F. Tg.-Mureș a urmărit efectul părților aeriene ale plantei *Hibiscus trionum* L. (2).

Astfel, Feszt și colab. (1), efectuând experiențe pe șobolani, au stabilit un indice diuretic de 1,44, lucrând cu un extract din frunzele plantei și care depășește indicele teofilinei (1,28), luată ca substanță de referință.

Pentru justificarea acțiunii diuretice prin compoziția sa chimică noi ne-am propus întreprinderea unui studiu fitochimic al acestei plante. Se știe că flavonozidele au o marcată acțiune diuretică, fapt pentru care ne-am îndreptat cercetările, în primul rând, în acest sens. În vederea identificării flavonozidelor am recurs la metoda cromatografică.

Pentru studiu am luat în lucru părțile aeriene (tulpini, frunze și flori) ale plantei, primită de la Catedra de farmacognozie din Tg.-Mureș, cit și produsul recoltat de noi în vara anului 1965 din împrejurimile orașului Iași (Valea lui David).\*

Din produsul uscat și mărunțit s-a efectuat un extract etanolic 10% cu ajutorul căruia am realizat cromatograme circulare rapide pentru punerea în evidență a flavonozidelor. Cromatogramele efectuate au fost supuse observației în lumină Wood înainte și după expunere la vapori de amoniac sau pulverizate cu soluții de săruri de zirconiu și aluminiu.

Faptul că spoturile cu fluorescență brună și galbenă de pe cromatogramele native, decupate și eluate cu alcool, au dat reacția cianidinei pozitivă, cit și fluorescența galbenă caracteristică în lumină Wood, după revelarea cu săruri de zirconiu, ne-au arătat că flavonozidele sînt prezente în părțile aeriene ale plantei *Hibiscus trionum* L. (fig. 1).

Pornind de la o cantitate mai mare de produs vegetal, am efectuat extracții alcoolice în scopul obținerii flavonelor puse în evidență. În cantitate suficientă pentru a întreprinde un studiu mai detaliat.

Extractul obținut prezintă inconvenientul unui conținut bogat în clorofilii care ne împiedică în izolarea flavonozidelor, iar înlăturarea ei prezintă greutăți. Pe de altă parte, literatura consultată (3) arată că o serie de flavonozide sînt hidrolizate în prezența clorofilei. Am căutat să îndepărtăm cit se poate de repede clorofila, iar pe de altă parte am căutat să împiedicăm hidroliza din timpul extracției la reflux, datorită prezenței acizilor organici, prin adăugare de carbonat de calciu în sistem.

Extractul alcoolic, concentrat la sec sub presiune redusă, se obține la rîndul său cu eter etilic, pînă ce acesta trece incolor. Se îndepărtează astfel

\* Mulțumim și pe această cale tov. conf. dr. G. Răcz pentru amabilitatea de a ne fi pus la dispoziție materialul necesar.

clorofila și o parte din substanțele lipofile, precum și agliconii flavonici, solu-  
bili în eter. Reziduul obținut, de culoare galbenă brună, conține totalul de  
flavonozide din produsul supus extracției.

Am mai utilizat pentru obținerea flavonozidelor și alte metode citate în:  
literatura consultată (4, 5), dar care nu au dat randamentul așteptat, fie din  
cauza cantităților prea mici de principii active, conținute în materialul supus  
cercetării, fie din cauza procedeelelor de lucru greoaie și de lungă durată.

Pentru a determina, dacă în produsul studiat sînt prezente una sau mai  
multe flavonozide și dacă acestea provin de la unul sau mai mulți agliconi,  
am recurs la un procedeu folosit de unul din noi cu prilejul unui alt studiu  
(6, 7), în care se efectuează cromatograme preparative circulare în scopul  
descompunerii lor. O mică parte din reziduu se dizolvă în etanol, iar soluția  
alcoolică se aduce în cromatogramă circulară pe hîrtie Whatman 4. Cromatogramă  
developată, uscată la temperatura camerei, se observă în lumină  
Wood. Se conturează cu ajutorul unui creion spotul periferic cu fluorescență  
brună, corespunzător flavonozidelor. Acesta se decupează, se eluează cu al-  
cool și soluția se cromatografiază în sistem ascendent, de asemenea prepara-  
tiv, pe hîrtie Whatman 4, pipetînd spoturi lineare de 5 cm lungime. Se se-  
pară trei spoturi sub forma a trei benzi care se conturează în lumină Wood,  
se decupează, se eluează ca mai sus și se recromatografiază separat, alături  
de soluția nedescompusă (fig. 2.).

Toate dezvoltările în procedeu ascendent au fost efectuate în sistemul  
de solvenți al lui Forestal pentru glicozide (8). Cromatogramele ne relevă că  
în părțile aeriene ale plantei *Hibiscus trionum* L. sînt prezente trei heterozide  
flavonice avînd Rf: 0.43—0.52—0.63. Același rezultat l-am obținut, efectuînd  
cromatogramele și în alte sisteme de solvenți. Rezultatele și valorile Rf. sînt  
redate în tabelul 1.

Pentru determinarea numărului de agliconi am recurs la același sistem  
de descompunere a cromatogramelor, utilizînd pentru aceasta soluția obți-  
nută din eluarea spotului corespunzător agliconilor pe cromatograma prepa-  
rativă circulară ca și precipitatul obținut prin hidroliză cu acid clorhidric 5%,  
al reziduului ce conține totalul de flavonozide dizolvat în etanol.

În tabelul 2 redăm valorile Rf. privind agliconii, folosînd diferite sisteme  
de dezvoltare și diferite hîrtii cromatografice.

Concluziile trase au fost confirmate prin cromatogramele în strat subțire de  
poliamidă (9, 10) (fig. 3), cit și prin cromatogramele bidimensionale (10) (fig. 4).  
Acestea ne-au arătat în mod evident prezența a trei heterozide flavonice derivate  
de la trei agliconi.

### *Partea experimentală*

#### *Extracția flavonelor*

1200 gr provenind din părțile aeriene ale plantei *Hibiscus trionum* L. pul-  
verizate, se extrag în trei rînduri cu cantități potrivite de alcool etilic, pe baie  
de apă la reflux. Pentru împiedicarea hidrolizei flavonozidelor am adăugat în  
tîmpul extracției 1,5 g carbonat de calciu. Extractele etanolice de culoare verde,  
reunite, se concentrează la presiune și temperatură scăzută pînă la consistență  
siropoasă. Reziduul de culoare verde închis se extrage cu eter etilic, în mai multe  
rînduri, pînă ce acesta trece incolor. Se îndepărtează astfel clorofila și o serie de  
substanțe lipofile.

Pentru a recupera agliconii extrasi de către eter sau cei proveniți dintr-o  
eventuală hidroliză a flavonozidelor în timpul extracției, lichidul eteric de cu-  
loare verde s-a agitat cu o soluție 4% de bicarbonat de sodiu. Soluția alcalină de  
culoare galbenă intensă se acidulează și se agită cu eter care extrage numai agli-

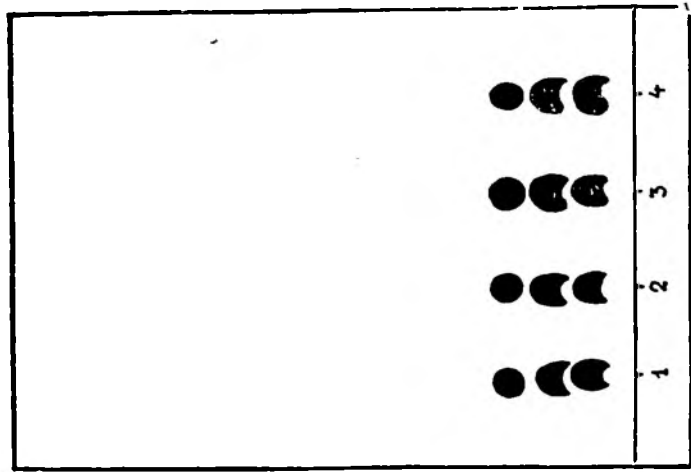


Fig. nr. 3: Cromatograma pe strat subțire de poliamidă pentru agliconii flavonici

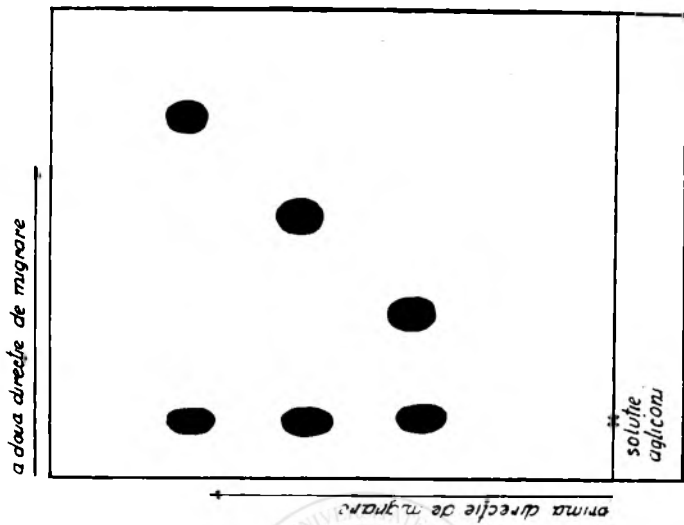


Fig. nr. 4: Cromatograma bidimensională pentru agliconii flavonici

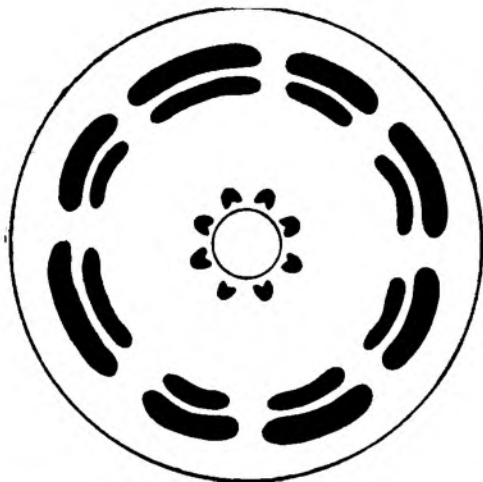


Fig. nr. 1: Cromatograma circulară a extractului etanolic  
10% în lumina Wood, după stropire cu săruri de zirconiu.

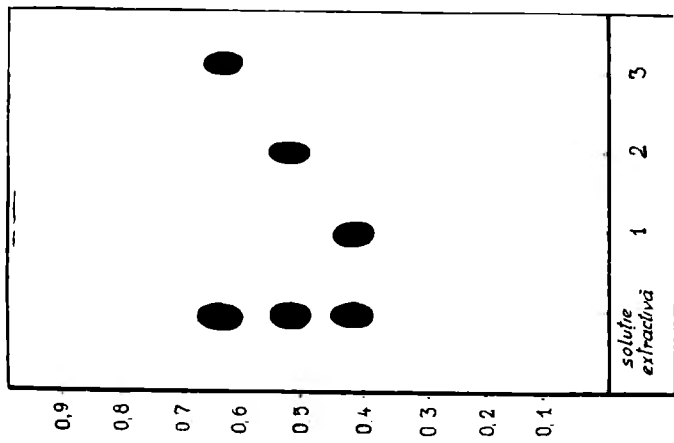


Fig. nr. 2: Cromatograma descompusă pentru heterozizidele  
flavonice



**Tabelul nr. 1.**  
Valorile R<sub>f</sub> pentru heterozidele flavonice.

| Sistemul de dezvoltare   | Hirtia<br>cromatografică      | Spotul |      |      |
|--|-------------------------------|--------|------|------|
|  |                               | 1.     | 2.   | 3.   |
| Acid acetic — acid clorhidric<br>— apă (15:3:32) Forestal<br>pentru glicozide. | Sch-Sch* 2043 b.<br>M. N. 261 | 0,43   | 0,52 | 0,63 |
|  |                               | 0,41   | 0,52 | 0,65 |
| n-Butanol — acid acetic —<br>apă (4:1:5)<br>Partridge                          | Sch-Sch 2043 b.<br>M. N. 261  | 0,37   | 0,72 | 0,86 |
|  |                               | 0,73   | 0,87 | 0,97 |
| Acetat de etil — acid formic<br>— apă (10:2:3)                                 | Sch-Sch 2043 b.<br>M. N. 261  | 0,73   | 0,83 | —    |
|  |                               | 0,73   | 0,82 | —    |
| Acid acetic — apă (6:2)  | Sch-Sch 2043 b.<br>M. N. 261  | 0,66   | 0,74 | —    |
|  |                               | 0,63   | 0,71 | —    |

\* Sch-Sch: Hirtie cromatografică Schleicher-Schüll 2043 b.  
M. N.: Macherey Nagel 261.

**Tabelul nr. 2.**  
Valorile R<sub>f</sub> pentru agliconii flavonici.

| Sistemul de dezvoltare  | Hirtia cromatografică        | Agliconi izolați<br>de pe cromatograma<br>preparativă |      |      | Agliconi izolați<br>după hidroliză |      |      |
|---|------------------------------|---|------|------|------------------------------------|------|------|
|   |                              | 1.  | 2.   | 3.   | 1.                                 | 2.   | 3.   |
| Acid acetic — acid clorhidric — apă<br>(30:3:10). Forestal pt.<br>agliconi. | Sch-Sch* 2043 b<br>M. N. 261 | 0,18  | 0,26 | 0,40 | 0,18                               | 0,25 | 0,40 |
|   |                              | 0,22  | 0,27 | 0,39 | 0,22                               | 0,28 | 0,39 |
| n-Butanol — acid acetic — apă<br>(4:1:5)<br>Partridge                       | Sch-Sch 2043 b.<br>M. N. 261 | 0,23  | 0,42 | 0,52 | 0,23                               | 0,41 | 0,52 |
|   |                              | 0,24  | 0,38 | 0,52 | 0,24                               | 0,37 | 0,52 |
| Acetat de etil — acid formic — apă<br>(10:2:3)                              | Sch-Sch 2043 b.<br>M. N. 261 | 0,36  | 0,48 | 0,57 | 0,36                               | 0,46 | 0,56 |
|   |                              | 0,27  | 0,46 | —    | 0,27                               | 0,47 | —    |
| Acid acetic — apă<br>(6:2).   | Sch-Sch 2043 b.<br>M. N. 261 | 0,28  | 0,40 | —    | 0,28                               | 0,40 | —    |
|   |                              | 0,29  | 0,42 | —    | 0,28                               | 0,41 | —    |

\* Sch-Sch: Hirtie cromatografică Schleicher-Schüll 2043 b.  
M. N.: Macherey Nagel 261.

conii flavonici. Acești agliconi, ca și cei obținuți prin hidroliza acidă a flavonozidelor, au fost folosiți pentru determinările cromatografice ulterioare.

Reziduu heterozidic obținut după îndepărtarea clorofilei s-a folosit pentru studiul cromatografic al flavonozidelor.

### 1. Hidroliza acidă

1 g reziduu siropos, de culoare brună, se aduce într-un mic balon cu 25 ml acid clorhidric 5% și se încălzește pe baie de apă în fierbere, la reflux, timp de 40 minute. Se produce o precipitare a agliconilor sub formă de particule pufoase. Se răcește și se agită cu eter pînă ce acesta nu se mai colorează. Soluția eterică se folosește direct pentru studiul cromatografic.

### 2. Cromatograma circulară

Hirtie Schleicher & Schüll 2043 b. (12×12 cm).

Sistem de solvenți: metanol — acid acetic — apă (4:0,25:6)

Revelare: în lumină Wood, înainte și după expunere la vapori de amoniac sau stropire cu soluție 2% de oxiclurură de zirconiu, soluție 5% de clorură de aluminiu (fig. 1).

### 3. Cromatograma circulară preparativă

Hirtie Whatman 4 (21×21 cm).

Sistem de solvenți: metanol — acid acetic — apă (4:0,25:6).

Revelare: observația în lumină Wood. Se conturează spoturile cu creionul, se decupează, se taie mărunt cu un foarfece din materia! inoxidabil și se extrage la reflux cu metanol. Soluția obținută după filtrare se utilizează pentru descompunerea cromatogramelor ascendente.

### 4. Cromatograma ascendentă

4. 1. cromatograma preparativă.

Hirtie Whatman 4 (6 40 cm).

Sistem de solvenți:

a) pentru heterozide — Forestal pentru glicozide: acid acetic — acid clorhidric — apă (15:3:82);

b) pentru agliconi — sistem Forestal pentru agliconi: acid acetic — acid clorhidric — apă (30:3:10).

Revelare: în lumină Wood, conturare cu creionul, decupare și tratare după același procedeu ca la cromatograma preparativă circulară.

4. 2. Cromatograma pentru identificarea heterozidelor.

Hirtie Schleicher & Schüll 2043 b sau Macherey Nagel 261.

Sistem de solvenți:

a) Forestal pentru glicozide: acid acetic — acid clorhidric — apă (15:3:82) (fig. 2);

b) Acetat de etil — acid formic — apă (10:2:3);

c) Acid acetic — apă (6:2);

d) n-Propanol — acetat de etil — apă (6:1:3);

e) Solvent Partridge: n-Butanol — acid acetic — apă (4:1:5).

Revelare: UV, soluție metanolică 2% de oxiclurură de zirconiu, soluție etanolică 5% de clorură de aluminiu, expunere la vapori de amoniac

4. 3. Cromatograme pentru identificarea agliconilor.

Hirtie Whatman 2, Schleicher & Schüll 2043 b. sau Macherey Nagel 261.

Sistem de solvenți:

a) Sistem Forestal pentru agliconi: acid acetic — acid clorhidric — apă (30:3:10) (fig. 3);

b) Solvent Partridge: n-Butanol — acid acetic — apă (4:1:5);

c) Acetat de etil — acid formic — apă (10:2:3).

Revelare: Ca la 4. 2.

## 5. Cromatograma bidimensională

### 5. 1. Pentru heterozide.

Se efectuează pe bucăți de hirtie cromatografică de dimensiuni 30×30 cm rulate sub formă de cilindru și introduse cu capătul inferior într-o cutie Petri, ce conține sistemul de solvenți, într-un bac cu atmosferă saturată.

Hirtie Schleicher & Schüll 2043 b.

Sistem de solvenți: prima direcție sistem Forestal pentru glicozide; a doua direcție sistem Forestal pentru glicozide sau solvent Partridge.

Revelare: ca la 4. 2.

### 5. 2. Pentru agliconi.

Hirtie Schleicher & Schüll 2043 b.

Sistem de solvenți: prima direcție sistem Forestal pentru agliconi; a doua direcție sistem Forestal pentru agliconi sau solvent Partridge.

Revelare: ca la 4. 2. (fig. 4).

## 6. Cromatograma pe strat subțire de poliamidă

6. 1. Obținerea poliamidei: 100 g grănule polimer caprolactamic (Săvinești) se dizolvă într-o cantitate convenabilă de fenol (cca. 2 kg), pe baie de apă, la reflux. Soluția viscoasă rezultată se toarnă într-un volum mare de metanol pentru precipitare. Se agită puternic și se lasă să se depună. Precipitatul obținut se filtrează, se spală bine cu metanol până la îndepărtarea urmelor de fenol și se păstrează sub un strat de metanol pur.

6. 2. Obținerea plăcilor. Se filtrează 10 g pulbere de poliamidă și se triturează bine la mojar cu 1,5 g gips și 8 ml amestec metanol-acetonă (1 : 1). Amestecul se repartizează pe 5 plăci de sticlă (10×15 cm), clătindu-le într-o parte și în alta, până la repartizarea într-un strat uniform a pastei pe placă. Se usucă la temperatura camerei.

6. 3. Efectuarea cromatogramelor. Soluția de agliconi se aduce pe punctele de start la distanță de 1,5 cm de marginea plăcii. Se lasă să se evapore solventul și se introduce placa cu capătul de start într-o cutie Petri ce conține amestecul de solvenți. Totul este conținut într-un excicator cu atmosferă saturată în vapori de solvenți. Se lasă să migreze 10 cm.

Sistem de solvenți: cloroform — metanol—metil-etil-acetonă (12:2:1).

Revelare: ca la 4. 2. (fig. 3).

## Concluzii

Pentru a justifica acțiunea diuretică a părților aeriene ale plantei *Hibiscus trionum* L., am efectuat un studiu cromatografic al flavonozidelor din acest produs, stabilind următoarele:

1. Am pus în evidență prezența a trei flavonozide.

2. Prin hidroliza flavonozidelor rezultă agliconii flavonici pe care i-am determinat a fi, de asemenea, în număr de 3.

Sosit la redacție: 20 septembrie 1966.

## Bibliografie

1. FESZT G., ELISABETA-RĂCZ KOTILLA, BERCZI J., RĂCZ G.: Farmacia, (1962), 10, 651; 2. RĂCZ G., CAROLINA LAZĂR-SZINI: Revista Medicală, (1964), 3, 345; 3. LIST P. H., HANAFI S.: Arch. Pharm., (1965), 298, 107; 4. BIELLIG H. J., B.: (1944), 77, 748; 5. FAUGERAS G., PARIS R.: Ann. pharm. franc. (1962), 20, 217; 6. GRIGORESCU E.: Teză doctorat, București, 1963; 7. GRIGORESCU E., CONTZ O.: Die Pharmazie, (1966), 21, 116; 8. FRIEDRICH H.: Arch. Pharm., (1962), 255, 59; 9. HOTON-DORGE, M., J.: J. Pharm. Belg. (1963), 1—2, 3; 10. EGGER K., MANFRED K.: Ztschr. anal. Chem., (1965), 210, 201.