

STUDIUL CROMATOGRAFIC AL PRINCIPILOR ANTRACHINONICE DIN ROIBĂ (RUBIA TINCTORUM L.)

I. *Formanek*

În literatura de specialitate se găsesc unele date referitoare la prepararea medicamentelor din roibă (2, 20, 30).

În ultimele decenii, numeroşi autori au studiat acţiunea farmacologică a preparatelor de roibă, arătând puterea lor de acidifiere a urinei şi acţiunea lor litică asupra calculilor renali formaţi mai ales din carbonaţi, fosfaţi şi oxalaţi (5, 6, 13, 19, 20, 30). Acţiunea terapeutică a preparatelor este legată de prezenţa derivaţilor hidroximetilantrachinonici care formează chelaţi cu substanţele din calculii renali (5, 12, 13, 18, 20).

După unii autori, acţiunea terapeutică a drogului se datoreşte exclusiv glicozidelor, iar după alţii acţiunea preparatelor depinde şi de prezenţa agliconilor (12, 20, 26).

În drog, sub formă glicozidică, sînt prezenți: acidul ruberitric (1, 2-dioxi-antrachinonă și primveroză), galiozinul (acid 1, 2, 4-trihydroxiantrachinon-3-carboxilic și primveroză) și rubiadin-primverozida (1, 3-dioxi-2-metil-antrachinonă și primveroză), iar în cursul depozitării apare și rubiadin-glicozida (1, 3-dioxi-2-metil-antrachinonă și glucoză) (2, 11, 13, 14, 25). Pe lângă aceste glicozide — după hidroliza prealabilă a drogului — se găsesc agliconi liberi, sub formă de hidroxi- și hidroximetilantrachinone ca: alizarina (1, 2-dioxiantrachinonă), purpurina (1, 2, 4-trioxiantrachinonă), pseudopurpurina (acid 1, 2, 4-trihydroxiantrachinon-3-carboxilic), rubiadinul (1, 3-dioxi-2-metil-antrachinonă), purpuroxantina (1, 3-dioxiantrachinonă) și munjistina (acid 1, 3-dioxiantrachinonă-2-carboxilic) ultima se găsește în drog și ca aglicon liber pe lângă antraglicozide (2, 11, 14, 20, 25, 28).

Reacția Borntrager, executată cu hidroxid de sodiu, potasiu sau amoniac, pune în evidență prezența antrachinonelor, dînd cu unele principii active colorații roșii-violete de diferite nuanțe, dar nu permite o apreciere diferențială specifică a componentelor.

Principiile active din roibă se pot separa relativ ușor prin metode cromatografice pe hîrtie. Cercetările lui *Rybacki* (25) și *Nikonov* (20) se îndreaptă spre determinarea calității și stabilității principiilor active din rădăcinile roibei. *Lutomski* și *Raszeja* (17) pentru analiza antraglicozidelor din roibă descriu tot o metodă cromatografică pe hîrtie arătînd că, rădăcinile și stolonii conțin anumite cantități de derivați antrachinonici, tulpina conține însă numai urme.

Cu toate că numeroase publicații se referă la dozări cantitative prin metode cromatografice pe hîrtie (4, 16, 21, 22), acest procedeu rămîne în primul rînd un instrument de identificare a principiilor active din droguri sau în vederea verificării purității substanțelor izolate (8, 9, 10, 17, 24).

Partea experimentală

Experiențe în vederea identificării derivaților antrachinonici ai roibei pe cale cromatografică pe hîrtie.

Pentru izolarea antraglicozidelor pe cale cromatografică pe hîrtie am întrebuițat un extract de etanol, preparat în felul următor:

0,40 g drog fin pulverizat se fierbe cu 20 ml de etanol 70% timp de 15 minute pe baie de nisip electrică, într-un balon prevăzut cu un refrigerant cu reflux. Soluția alcoolică caldă se filtrează și se completează la 20 ml.

Pentru izolarea antrachinonelor libere am folosit un alt extract de etanol, după cum urmează:

0,40 g drog fin pulverizat se fierbe cu 20 ml de etanol 70% care conține 1 ml acid clorhidric 34%, timp de 15 minut pe baie de nisip electrică, într-un balon prevăzut cu un refrigerant cu reflux. Soluția alcoolică încă caldă, după filtrare, se completează la 20 ml.

Am întrebuițat benzi de hîrtie Schleicher-Schüll nr. 2043 b și Whatmann nr. 1, avînd dimensiunile 3×26 cm, iar pentru migrare bidimensională hîrtii de 20×20 cm. Extractul etanolic a fost aplicat pe hîrtie cromatografică în cantitate de 0,02—0,03 ml. Am folosit metoda ascendentă, încercînd mai multe (metode) sisteme de irigare (7, 8, 9, 16, 25, 27).

Dintre sistemele de irigare, amestecul Partridge (n-butanol-acid acetic-apă, 4:1:5) a dat rezultatele cele mai bune, atît la separarea glicozidelor, cît și la izolarea agliconilor.

În figura nr. 1 sînt prezentate cromatogramele derivaților antraglicozidici (fig. nr. 1).

Am obținut spoturi distincte, în diferite culori, încă înaintea aplicării sistemelor de dezvoltare. Cromatogramele au fost analizate la lumină ultravioletă, observîndu-se fluorescențe intensive. În vederea dezvoltării spoturilor am tratat benzile cu următorii reactivi: vapori de amoniac, soluție de NaOH 5% cu conținut de 2% amoniac, soluție de borax 5%.

I. FORMANEK: STUDIUL CROMATOGRAFIC AL PRINCIPILOR ANTRACHINONICE DIN ROIBA (RUBIA TINCTORUM L.)



Fig. nr. 1



Antraglicina
1
2

Fig. nr. 2



Fig. nr. 3

I. FORMANEK: STUDIUL CROMATOGRAFIC AL PRINCIPILOR ANTRACHINONICE DIN ROIȚĂ (RUBIA TINCTORUM L.)



Fig. nr. 4

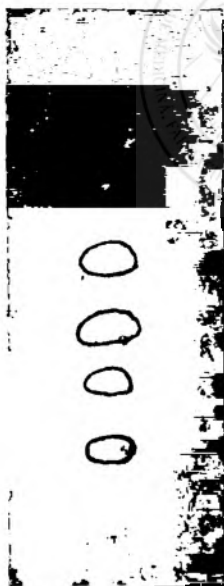


Fig. nr. 5

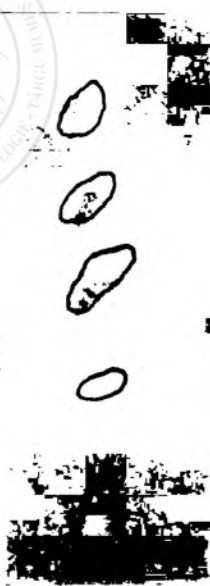


Fig. nr. 6

Separarea spoturilor derivaților antraglicozidici, prin aplicarea migrării în cromatografie bidimensională este și mai evidentă (vezi figura nr. 2).

Valorile Rf ale spoturilor obținute din primul extract alcoolic și natura chimică a principiilor active sînt cuprinse în tabelul nr. 1.

Valorile Rf ale spoturilor obținute, comparate cu substanțele de referință (acid ruberitric și galiozin obținute prin metoda Hill-Richter (29) și *Raszeja* (23)) și cu datele bibliografice (20, 23, 25) dovedesc că, spoturile care au valorile Rf egale cu 0,29; 0,49 și 0,54 sînt antraglicozide (galiozin, acid ruberitric și rubiadin-primverozidă), iar spotul avînd Rf egal cu 0,20 este antrachinona liberă (munjistina). Spotul cu o fluorescență albastră în raze UV (Rf: 0,65) după *Knott* (15) pare a fi asperulozidă care, după hidroliză scindează în toluchinidonă și pentoză.

Pe hîrtia impregnată în prealabil cu o soluție de carbonat de sodiu 5% (3, 9), antrachinonele apar în spoturi colorate în roz-roșu-violet. Procedul impregnării hîrtiei cu o diluție de proteine din ser sanguin 0,5% corespunde cu adîncirea colorației pronunțate a derivaților antrachinonici.

Pentru separarea antrachinonelor libere am folosit al doilea extract etanolic, prealabil hidrolizat cu acid clorhidric. Sistemul de irigare și dezvoltare coincide cu cel descris la antraglicozide. În fig. nr. 3 sînt prezentate cromatogramele antrachinonelor libere (a doua bandă netratată cu reactivi). Separarea spoturilor derivaților antrachinonici prin aplicarea migrării în cromatografie bidimensională este și mai netă (vezi fig. nr. 4).

Valorile Rf ale spoturilor obținute din al doilea extract alcoolic hidrolizat și natura chimică a substanțelor sînt prevăzute în tabelul nr. 2.

Din datele tabelului nr. 2 reiese că numărul spoturilor s-a mărit, au apărut noi derivați antrachinonici, produși de scindare ai antraglicozidelor, de exemplu pseudopurpurina, purpuroxantina și purpurina din antraglicozida galiozin, rubiadinul din rubiadin-primverozidă.

Experiențe în vederea identificării derivaților antrachinonici ai roabei pe cale cromatografică pe strat subțire

Pentru izolarea derivaților antrachinonici (combinați și liberi) pe cale cromatografică pe strat subțire, am folosit extractele descrise anterior.

Am întrebuițat plăci de sticlă cu silicagel, avînd dimensiunile de 9×24 cm, iar pentru migrare bidimensională de 20×20 cm (Kieselgur „Merck“ 20 g, caolină pură 5 g, apă dist. 60 g; activare la temperatură de 105° C timp de 20 minute).

Dintre sistemele de irigare, amestecul butanol-acetat de etil-apă (2:1:2), descris de *Betts* (8), a dat rezultatele cele mai bune, atît la antraglicozide, cît și la antrachinonele libere. Cantitatea de extract alcoolic folosită pentru o cromatogramă a fost de 0,06 ml.

La izolarea derivaților antraglicozidici am obținut patru spoturi de culoare roșie-portocalie, care prin dezvoltare cu vapori de amoniac (în general cu reacției susamintiți) se accentuează.

Spoturile au valorile cuprinse între 0,20—0,23; 0,27—0,30; 0,45—0,47; 0,53—0,60, valori care corespund munjistinei, galiozinului, acidului ruberitric și rubiadin-primverozidei (fig. nr. 5).

Pe cromatograma antrachinonelor libere se pot observa patru spoturi pronunțat distincte, cu valori Rf de 0,27; 0,50; 0,55 și 0,62, dar greu apreciabile în comparație cu spoturile obținute prin cromatografiere pe hîrtie (fig. nr. 6).

Tot cu această metodă am reușit evidențierea glucidelor scindate din antra-

glicozide, cu valori Rf 0,28 și 0,34, corespunzând glucozei și xilozei. Spoturile le-am dezvoltat cu reactiv de antronă dizolvat în acid sulfuric (antronă 1 g, acid sulfuric conc. 350 g, apă dist. 150 g)

În figura nr. 5 și 6 sînt prezentate cromatogramele derivațiilor antrachinonici ai roibei pe cale cromatografică pe strat subțire.

Concluzii

Separarea derivaților antrachinonici existenți în rădăcinile de roibă a reușit pe cale cromatografică pe hirtie și pe strat subțire, cu sistemul de irigare format din butanol n.-acid acetic-apă (4:1:5) și butanol n.-acetat de etil-apă (2:1:2).

S-au separat trei spoturi de antraglicozide (Rf: 0,29; 0,49; 0,54) care corespund glicozidelor de galiozin, acid ruberitric, rubiadin-primverozidă iar după hidroliză prealabilă antrachinonele libere apar în șase spoturi (Rf: 0,28; 0,34; 0,68; 0,89; 0,90; 0,91), care corespund munjistinei, purpuroxantinei, pseudopurpurinei, rubiadinului, alizarinei, purpurinei.

Spotul cu o fluorescență albastră în raze UV (Rf: 0,65) pare a fi glicozida asperulozidă (15).

Antraglicozidele folosite ca substanțe de referință au fost obținute prin metoda Hill-Richter (29) și Raszeja (23).

S-au pus în evidență glucidele scindate din antraglicozide cu valori Rf: 0,28 și 0,34, corespunzând glucozei și xilozei.

Sosit la redacție: 17 iunie 1969.

Bibliografie

1. ADAM L.: Contribuții la studiul farmacognostic al plantei *Rumex alpinus* L. Teză de doctorat I.M.F. Tirgu Mureș, 1963; 2. AUSTER F., SCHÄFFER JOHANNA: *Arzneipflanzen* (8 Lieferung) 23, *Rubia tinctorum* L. VEB Georg. Thieme, Leipzig, 1955; 3. AUETERHOFF H., MAISS N.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* (1958), 98, 659; 4. AUETERHOFF H., MAISS N.: *Pharm. Ztg.* (1959), 104, 117; 5. BAUER A.: *Z. f. Urol.* (1920), 14, 175; (1923), 17, 274; (1924), 18, 452; cit. Rybacki E. (24); 6. BAUER A.: *Münch. Med. Wsch.* (1924), 71, 206 (cit. Rybacki, 24); 7. BAUMGARTNER R., LEUPIN K.: *Pharm. Acta Helv.* (1961), 36, 244; 8. BETTS T. I., FAIRNBAIN J. W., MITAL V. K.: *J. Pharm. Pharmacol.* (1958), 10, 436; 9. CUCU V., TARPO E.: *Die Pharmazie*, (1962), 17, 364; 10. HORHAMMER L., LEUE K. W.: *Arch. Pharmaz.* (1955), 288/60, 377; 11. KARRER W.: *Constitution und vorkommen der Organischen Pflanzenstoffe*—Birkhauser Verlag—Basel und Stuttgart (1958), 496; 12. KELLER J., GÖRLICH B.: *Z. f. Urol.* (1944), 1, 38 (cit. Rybacki, 24); 13. KELLER J.: *Pharmazie* (1951), 6, 675; 14. KLEIN G.: *Handbuch der Pflanzenanalyse* vol. I, II, Springer Verlag, 1932; 15. KNOTT R. P., McCUCHEON ROB. S.: *Journal of Pharm. Scienc.* (1961), 50, 936; 16. KRAUS L.J.: *Pharmazie* (1957), 12, 693; 17. LUTOMSKI J., RASZEJA WANDA: *Farmacja Polska* (1967), 23, 7—8, 613; 18. MADAUS G.: cit. 2; 19. MADAUS G., SCHINDLER H.: cit. 24; 20. NIKONOV G. K.: *Aptecinoe delo* (1962), 2, 31; 21. PARIS R., DURAND M.: *Ann. pharm. franc.* (1956), 14, 755; 22. PARIS R., DURAND M.: *Ann. pharm. franc.* (1959), 17, 593; 23. RASZEJA WANDA: *Herba Polonica* (1966), 2, 106; 24. RYBACKI E.: I. *Dissert. pharm.* (1965), 2, 3, 336; 25. RYBACKI E.: II. *Dissert. pharm.* (1965), 2, 3, 339; 26. SCHINDLER H.: *Inhaltstoffe und Prüfungsmethoden homeopatisch verwendeter Heilpflanzen*. Cantor, Aulendorf u. Wurttemberg; 27. SHIBATA S., TAKIDO M., TANAKA O.: cit. 24; 28. THOMSON R. H.: *Naturally occurring quinones*. Butterworths London 1957; 29. TRIM A. R.: *Glycosides as a General Group in PAECK K.* — TRACCEY M. F.: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* vol. II, 295; 30. TUROVA A. D.: *Lecastvenie rastenija S.S.S.R. i ih primenenie*. Medicina Moskva 1967.

Tabelul nr. 1.

Identificarea antraglicozidelor

Valorile R_f ale spoturilor obținute pe hirtia Schleicher-Schüll 2043 b cu amestecul Partridge;
Durata irigării: 12 ore la benzi 3X26 cm și 2X7 ore la hirtii 20X20 cm la temperatura 20—28° C.

R _f	Culoarea spotului în diferite medii		Natura chimică a substanțelor	Comparații cu datele bibliografice
	la lumina solară	în raze UV în vapori de amoniac		
0,20	galbenă	galbenă	antrachinonă	munjistină (25)
0,29	galbenă	galbenă	antraglicozidă	galiozin (25)
0,49	galbenă	galbenă- portocalie	antraglicozidă	acid ruberitric (25)
0,54	galbenă	portocalie	antraglicozidă	rubiadin-primverozidă (25)
0,65	---	albastră	chinonă	asperulozidă (15)

Tabelul nr 2.

Identificarea antrachinonelor

Valorile Rf ale spoturilor obținute pe hîrtia Schleicher-Schüll 2043 b cu amestecul Partridge;
Durata irigării: 12 ore la benzi 3X26 cm și 2X7 ore la hîrtii 20X20 cm la temperatura 20—25° C.

Rf	Culoarea spotului în diferite medii			Natura chimică a substanțelor	Comparații cu datele bibliografice
	la lumina solară	în raze UV	în vapori de amoniac		
0,28	galbenă	galbenă-portocalie	roșie-purpurie	antrachinonă	munjistină (25)
0,34	galbenă	portocalie	roșie-violetă	antrachinonă	purpuroxantină (25)
0,65	— — — —	albastră	— — — —	chinonă	toluchinhidronă (15)
0,68	galbenă-portocalie	galbenă	roșie	antrachinonă	pseudopurpurină (25)
0,89	purpurie	galbenă	roză	antrachinonă	rubiadin (25)
0,90	purpurie	galbenă-brună	roșie-violetă	antrachinonă	alizarină (25)
0,91	purpurie	purpurie	violetă	antrachinonă	purpurină (25)