

Saponini i flavonoidi - antimikrobne tvari Flores bellidis

Tarle, Đurđica; Kosi-Ćulibrk, Emina

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2000, 56, 81 - 87**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:714877>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Saponini i flavonoidi – antimikrobne tvari Flores bellidis

DURĐICA TARLE¹ i EMINA KOSI-ĆULIBRK²

¹Zavod za farmakognoziju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb i

²Hrvatski zavod za kontrolu lijekova RH, Zagreb.

Saponins and flavonoids – antimicrobial agents in Flores bellidis

S u m m a r y – Two flavonoid substances and saponin compounds were isolated from the Flores bellidis drug. The isolated substances were tested for antimicrobial activity. Saponins and flavonoids had a positive antimicrobial effect on the microorganisms *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P and *Bacillus subtilis* ATCC 6633, whereas on *Candida albicans* ATCC 10231 and *Candida monosa* (nystatin-sensitive) only the isolated saponins had the antimycotic effect.

¹Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia and

²Croatian Institute for Medicines Control, Zagreb, Croatia

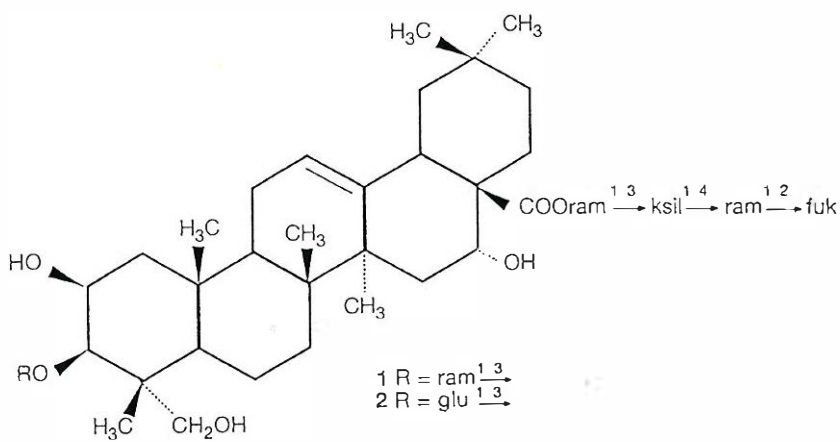
UVOD

Flores bellidis dobiva se od biljke *Bellis perennis* L., krasuljak ili tratinčica, porodica *Asteraceae* (*Compositae*). To je trajna livadna biljka na kojoj se kroz čitavu godinu razvijaju sitne glavice sa bijelim jezičastim i žutim cjevastim cvjetovima. Rasprostranjena je na tratinama po čitavoj Europi, u nekim dijelovima zapadne Azije, u sjevernoj Americi i drugdje. Sabiru se u proljeće pa sve do konca kolovoza cvjetovi (*Flores bellidis*), listovi (*Folia bellidis*), nadzemni dio (*Herba bellidis*) i sok iz svježe biljke (1).

Droga Flores bellidis upotrebljava se za poticanje teka, liječenje želučanih, jetrenih i žučnih tegoba, visokog krvnog tlaka i arterioskleroze, te kao ekspektorans u sastavu prsnih čajeva (2).

Bellis perennis L. sadrži vitamin C, karotin, slobodne aminokiseline (γ -aminomaslačna kiselina, alanin, serin i glicin). Droga nadalje sadrži acetilenske spojeve visokog stupnja nezasićenosti s 10–17 C atoma (3). Hegnauer (3) navodi nazočnost flavona apigeninskog derivata kozmosina, cijamidina, te kompleks triterpenskih saponina. Prema literaturi izolirano je više triterpenskih saponina, koji su nazvani belisaponini (4,5).

Uz navedene komponente droga Flores bellidis sadrži treslovine, smole, eterično ulje, šećere, sluz, gorke tvari, organske kiseline, masno ulje i inulin, što sve zajedno opravdava njenu raznolikiju primjenu u terapiji.



Strukture belisaponina



Bellis perennis L.

EKSPERIMENTALNI DIO

Materijali

a) Biljni materijal: Za ispitivanje kemizma flavonoida i saponina, te antimikrobnog učinka upotrijebljeni su cvjetovi biljke *Bellis perennis* L. skupljene u Botaničkom vrtu »Fran Kušan« Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu.

b) Za kromatografiju na tankom sloju silikagela (TS-kromatografija) upotrijebljene su gotove ploče DC-Alufolien, Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) Njemačka i pripremljene ploče sa silikagelom G, prema Stahlu, veličine 8 × 12 cm. Za odjeljivanje na stupcu upotrijebljen je silikagel za stupnu kromatografiju (Kemika, Zagreb).

c) Sustavi otapala za kromatografiju na tankom sloju:

Za ispitivanje flavonoida –

1. etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda 100:11:11:27
2. etilacetat – mravlja kiselina – voda 80:10:10 (6).
3. kloroform – metanol – voda 10:2:0,15 (7) i
4. benzen – aceton 9:1

Za ispitivanje saponina –

1. kloroform – metanol – voda 10:2:0,15 (7)
2. kloroform – metanol – voda 17,5:7,5:1,0 i
3. kloroform – metanol – voda 6,5:3,5:1,0 (8)

d) Reagensi za detekciju:

Borna kiselina – oksalna kiselina 3:1 (6) za flavonoide i klorosulfonska kiselina za saponine

e) Suspenzija eritrocita: 1 ml citratne krvi dopuni se u odmjerne tikvici od 100 ml pufer-otopinom do oznake.

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti obavljeno je metodom difuzije na krutoj hranjivoj podlozi prema farmakopeji. Za ispitivanje rabljeni su sljedeći mikroorganizmi: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-p, *Candida monosa* (osjetljiva na nistatin), *Escherichia coli* ATCC 10536, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23382, *Candida albicans* ATCC 10231 i *Sarcina lutea* ATCC 9341.

Aparati

Za detekciju flavonoida upotrijebljena je ultravioletna lampa (Camag, Mutenz, Švicarska). Uparavanje uz vakuum obavljeno je pomoću rotacijskog uparivača (Büchi, Laboratoriums Technik AG, CH-9230, Flawil, Švicarska). Kod preparativne kolonske kromatografije frakcije su skupljene pomoću aparata Ultra Rac 7000, LKB-S 161 25, Bromma, Švedska.

Metode ispitivanja

Ekstrakcija

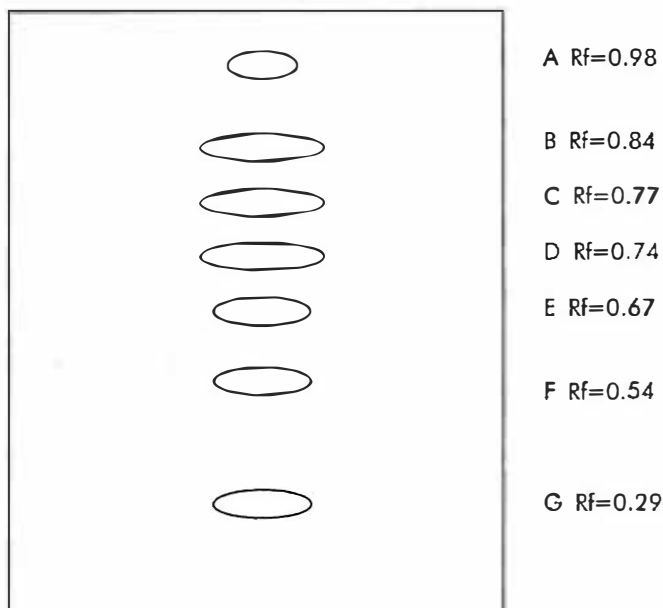
Biljni materijal je osušen na zraku i usitnjen. Metanolni ekstrakt droge pripremljen je postupkom perkolacije. Uparivanjem na rotacijskom uparivaču dobiven je sirovi ekstrakt »spissum«.

Ispitivanje flavonoida

Za ispitivanje flavonoida TS-kromatografijom rabljena su četiri sustava otapala, od kojih se najboljim pokazao sustav otapala etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda 100:11:11:27. Kao reagens za detekciju supstancije rabljena je smjesa borna kiselina – oksalna kiselina 3:1 (6). Nakon razvijanja kromatograma dobivene su četiri mrlje koje, promatrane pod UV-svjetlom (336nm), fluoresciraju žutozeleno. Mrlje odgovaraju supstancijama označenim s A, B, C i D određenih Rf-vrijednosti.

Ispitivanje saponina

Za odjeljivanje saponina TS-kromatografijom rabljena su tri sustava otapala, od kojih se najboljim pokazao sustav otapala kloroform – metanol – voda 10:2:0,15 (7). Na kromatogramu prskanom klorsulfonskom kiselinom dobiveno je sedam mrlja. Mrlje odgovaraju supstancijama obilježenim od A do G određenih Rf-vrijednosti (Sl. 1).

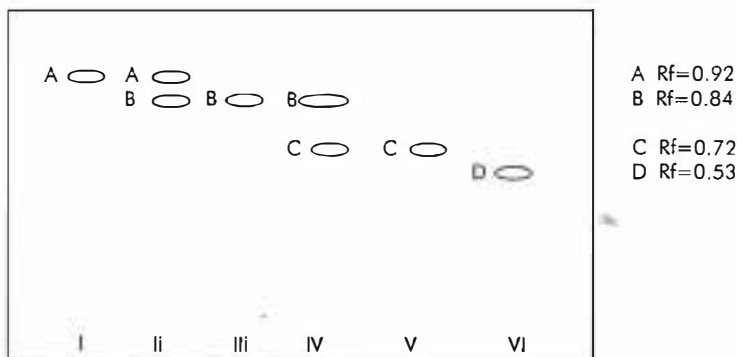


Sl. 1 TS-kromatogram metanolnog ekstrakta droge *Flores bellidis* u pogledu saponina, Sustav otapala: kloroform-metanol-voda 10,0:2,0:0,15 (7); Reagens za detekciju: klorsulfonska kiselina.

Izolacija flavonoida i saponina

Flavonoidi i saponini izolirani su na stupcu SiO₂ sustavima otapala, koji su se pokazali najboljim u prethodnom odjeljivanju supstancija TS-kromatografijom.

Odjeljivanjem flavonoida na stupcu dobiveno je šest frakcija, od kojih su četiri kromatografski jedinstvene i odgovaraju supstancijama A (Rf=0,92), B (Rf=0,84), C (Rf=0,72) i D (Rf=0,53) (Sl. 2).



Sl. 2. TS-kromatogram flavonoidnih supstancija droge Flores bellidis izoliranih na stupcu SiO₂ Sustav otapala: etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda 100:11:11:27; Reagens za detekciju: Borna kiselina – oksalna kiselina 3:1 (6).

Tablica 1
Zone inhibicije (mm × 10) izoliranih supstancija

Vrsta mikroorganizama	Flavonoid A koncentracija*		Flavonoid B koncentracija*		Saponini B + D koncentracija*		EtOH
	102	51	38	19	6	3	
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	260	210	220	–	295	195	0
Staphylococcus aureus ATCC 6538-p	210	170	175	–	240	230	0
Candida monosa (osjetljiva na nistatin)	–	–	–	–	320	150	0
Escherichia coli ATCC 10536	–	–	–	–	–	–	0
Bacillus subtilis ATCC 6633	245	185	205	145	250	200	0
Pseudomonas aeruginosa ATCC 23382	–	–	–	–	–	–	0
Candida albicans ATCC 10231	–	–	–	–	145	130	0
Sarcina lutea ATCC 9341	–	–	–	–	–	–	0

* koncentracija je izražena u mg/ml

Flavonoid A – 1.02 g otopljen u 10 ml 96% EtOH – konc 102 mg/ml

Flavonoid B – 0.38 g otopljen u 10 ml 96% EtOH – konc. 38 mg/ml

Saponin B+D – 0.06 g otopljen u 10 ml 96% EtOH – konc 6 mg/ml

Odjeljivanjem saponina na stupcu SiO_2 dobivena je smjesa supstancija B ($R_f=0,84$) i D ($R_f=0,74$). Smjesa supstancija B i D pokazala je »*in vitro*« preli-minarnu hemolitičku djelotvornost.

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti izoliranih supstancija

Izolirani flavonoidi i saponini podvrgnuti su ispitivanju antimikrobnog učinka. Ispitivanja su obavljena mikrobiološkom metodom difuzije na krutoj hranjivoj podlozi (9). Zone inhibicije očitane su nakon inkubacije na $35\text{ }^\circ\text{C}$ ti-jekom 17 sati. Rezultati ispitivanja iznijeti su u tablici 1.

RASPRAVA REZULTATA

Saponini su dokazani kromatografijom na tankom sloju. Na ploči prska-noj klorosulfonskom kiselinom dobiveno je sedam mrlja. Mrlje odgovaraju supstancijama A ($R_f=0,98$), B ($R_f=0,84$), C ($R_f=0,77$), D ($R_f=0,74$), E ($R_f=0,67$), F ($R_f=0,54$) i G ($R_f=0,29$) (Sl. 1).

Nazočnost flavonoida također je dokazana TS-kromatografijom (6). Pod UV-svjetlom na 336 nm vidljive su četiri mrlje koje fluoresciraju žutozeleno. Mrlje odgovaraju supstancijama A ($R_f=0,92$), B ($R_f=0,84$), C ($R_f=0,72$) i D ($R_f=0,53$). (Sl. 2).

Pretpostavljamo, prema podacima u literaturi da se radi o flavonoidima koji su derivati apigenina.

Saponini i flavonoidi izolirani su na stupcu SiO_2 sustavima otapala koji su se pokazali najboljim u odjeljivanju dotičnih supstancija TS-kromatogra-fijom. To je za saponine bio sustav otapala kloroform – metanol – voda 10:2:0,15 (7), a za flavonoide sustav otapala etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda 100:11:11:27. Nakon kolonske kromatografije na stupcu SiO_2 dobivene su jedinstvene flavonoidne supstancije A ($R_f=0,92$), B ($R_f=0,84$), C ($R_f=0,72$) i D ($R_f=0,53$) i smjesa saponinskih supstancija B ($R_f=0,84$) i D ($R_f=0,74$).

Flavonodi i saponini izolirani iz *Flores bellidis* pokazali su pozitivan an-timikrobni učinak na test-sojeve mikroorganizama *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-p i *Bacillus subtilis* ATCC 6633, dok su na test-sojeve *Candida albicans* 10231 i *Candida monosa* (osjet-ljiva na nistatin) antimikrobni učinak imali samo izolirani saponini. Iz dobi-venih zona inhibicija može se zaključiti da izolirana saponinska smjesa B + D ima jači antimikrobni učinak od flavonoida. Saponini su u znatnoj nižoj koncentraciji (6 mg/ml i 3 mg/ml) dali veće zone inhibicije od flavonoida u znatno višim koncentracijama (102 mg/ml, 51 mg/ml, 38 mg/ml i 19 mg/ml) (Tablica 1).

Literatura – References

1. F. Kušan, Ljekovito i drugo korisno bilje, Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb, 1956, 511, 514.
2. W. Spaich, Moderne Phytotherapie, Karl F. Haug Verlag, Heidelberg, 1979, 111.
3. R. Hegnauer, Chemotaxonomie der Pflanzen, Band 3, Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart 1964, 490, 493, 524.
4. T. Schoepke, V. Wray, A. Kunath, K. Hiller, Phytochemistry **31** (7), 2555 (1992).
5. K. Toki, N. Saito, T. Honda, Phytochemistry **30** (11), 3769 (1991).
6. M. Luckner, Prüfung von Drogen, Veb. G. Fischer Verlag, Jena, 1966, 215
7. J. Petričić, V. Petričić, N. Barišić-Poljak, Acta Pharm. Jug. **17** 29 (1967).
8. T. Kawasaki, K. Miyahara, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) **11** 1546 (1963).
9. M. Kupinić, Arh. farm. **29** 411 (1979).

Primljeno: 1. veljače 2000