

FLAVONOIDI OBIČNE (*Salvia officinalis* L.) I LEPLJIVE (*Salvia glutinosa* L.) ŽALFIJE

Dragan Veličković¹, Milena Nikolova², Stephanie Ivancheva², Vlada Veljković³

¹AD Zdravlje-Actavis, Farmaceutsko-hemijska industrija, Leskovac, Srbija

²Botanički institut Bugarske akademije nauka, Sofija, Bugarska

³Tehnološki fakultet, Leskovac, Srbija

Zbog značajnih bioloških efekata flavonoida, ova grupa jedinjenja analizirana je u običnoj (*Salvia officinalis* L.) i lepljivoj žalfiji (*Salvia glutinosa* L.). Ekstrakcija suve herbe i osušenog ostatka iz kojeg je prethodno izolovano etarsko ulje, izvršena je acetonom. Identifikacija flavonoida u ekstraktima vršena je tankoslojnom hromatografijom (TLC) i tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (HPLC).

Rezultati pokazuju da *S. officinalis* karakterišu apigenin i njegovi derivati (npr. apigenin-4'-metiletar), skutelarein-6-metiletar, izo-skutelarein-8-metiletar, luteolin i 6-OH-luteolin-6-metiletar. Vrstu *S. glutinosa* karakterišu apigenin, luteolin, 6-OH-luteolin-6-metiletar, kemferol-3-metiletar, kvercetin-3,7,3'-trimetiletar i kvercetin-3,7,3',4'-tetrametiletar. Pokazalo se da su flavonoidi prisutni i u materijalu iz kojeg je prethodno izolovano etarsko ulje. Zbog toga se i ovaj materijal, koji je uglavnom industrijski otpad, može dalje tretirati rastvaračima različite polarnosti u cilju izolovanja flavonoida.

Ključne reči: *Salvia officinalis* L., *Salvia glutinosa* L., flavonoidi, ekstrakcija, ostatak posle destilacije.

Uvod

Lekovitost pojedinih biljaka je poznata u narodnoj i oficijelnoj medicini. Kao visoko cenjena lekovita biljka, žalfija (*S. officinalis*) se koristi u narodnoj medicini još od davnina. Prema literaturnim podacima koristi se u lečenju više od 60 bolesti.

Terapeutski efekti mnogih tradicionalnih lekova mogu se pripisati prisustvu flavonoida, što je u vezi sa njihovom inhibicijom određenih enzima i antioksidativne aktivnosti. Smatra se da su oni izvanredni hvatači radikala u kompleksiranju gvožđa. Takođe, poseduju antibakterijsku [1], antifungalnu [2], antiviralnu [3] i antiinflamatornu [4] aktivnost. Dokazana je i antialergijska [1], antioksidativna [5], antimutagena [6] i ostale aktivnosti (protiv humanog karcinoma nazofarinksa, kod gastrointestinalnih oboljenja). Izoflavonoidi se povezuju sa opadanjem rizika kod raka dojke, prostate i kolona. Počeli su da se proučavaju za prevenciju menopauzalnih simptoma i osteoporoze [7]. Biološka aktivnost flavonoida zavisi od lokacije slobodnih hidroksilnih grupa na A prstenu, pre nego onih na B prstenu [8, 9].

Flavonoidi se mogu naći u svim biljnim delovima, pri čemu metode za izolovanje zavise od vrste flavonoidnih jedinjenja i količine biljnog materijala. Rastvarač za ekstrakciju se bira prema polarnosti flavonoida. Manje polarni rastvarači (benzen, hloroform) koriste se za ekstrakciju flavonoidnih aglikona, a polarniji (acetone,

alkohol) za ekstrakciju flavonoidnih glikozida [10]. Izoflavonoidi se mogu ekstrahovati smešom vode i metanola [11], etanola [12] ili acetonitrila [13, 14]. Murphy [15] je koristio etanol, metanol, aceton i acetonitril sa i bez dodavanja hlorovodonične kiseline. Veću efikasnost je pokazao 60 %-tni acetonitril u odnosu na 80 %-tni metanol [16]. Iz biljnog materijala flavonoidi se mogu izolovati i pomoću više rastvarača različite polarnosti. O prisustvu flavonoida u rodu *Salvia* L. ima podataka [17, 18].

Kako se pokazalo da je *S. officinalis* bogata monoterpenima a *S. glutinosa* seskviterpenima [19-22], cilj ovog rada je bio ispitati sličnosti ili razlike u sastavu i sadržaju flavonoida pomoću brze ekstrakcije acetonom [23, 24]. Takođe, iz ekonomskih i ekoloških razloga, ispitana je i mogućnost iskorišćenja materijala iz kojeg je prethodno izolovano etarsko ulje, a koji uglavnom predstavlja otpad u industriji.

Eksperimentalni deo

Biljni materijal:

Za ispitivanje je korišćen biljni materijal sa područja istočne i jugoistočne Srbije, sakupljen 2002. godine u fazi punog cvetanja: *S. officinalis* iz Sićevačke klisure (okolina Niša, selo Gradište, druga polovina maja) i *S. glutinosa* sa Strešera (okolina Surdulice, selo Vučedelce, prva polovina avgusta). Herbarski uzorci se čuvaju u Generalnom herbarijumu Balkanskog poluostrva (BEO) Prirodnjačkog muzeja u Beogradu, pod brojevima: BEO 32147 (*S. officinalis*) i BEO 32149 (*S. glutinosa*).

Bilje je brano u prepodnevni časovima, sušeno 15 dana u hladu na promajnom mestu, spakovano u papirnate kese i čuvano na suvom, hladnom i tamnom mestu. Droga je mlevena na mlinu Alpine sa sitom prečnika otvora 6 mm. Iz jednog dela biljnog materijala izolovano je etarsko ulje [25], a biljni ostatak je osušen i korišćen za ekstrakciju.

Priprema uzorka:

Ekstrakcija flavonoida iz samlevene herbe (H) *S. officinalis* i *S. glutinosa* i rezidualnog osušenog biljnog materijala iz kojeg je prethodno izolovano etarsko ulje (RBM), vršena je acetonom (odnos droga:rastvarač 1:5) uz stalno mućkanje. Nakon 5 minuta izvršena je filtracija (Filtrak No 388 11 cm Germany) i uparavanje tečnih ekstrakta do suva. Suvi ostatci su rastvoreni u 20 ml metanola, a dobijeni ekstrakti profiltrirani kroz filter papir 0,45 µm (Sartorius, Germany) i korišćeni za TLC i HPLC analizu. Identifikacija flavonoida vršena je u odnosu na standarde dobijene iz Botaničkog instituta Bugarske akademije nauka (Bugarska), pri koncentraciji u MeOH od 0,01 %.

TLC analiza:

Prisustvo i identifikacija flavonoida vršena je TLC metodom na tankom sloju silikagela (Aluminium Kieselgel 60 F₂₅₄ - Merck) kao sorbenta. Za razvijanje hromatograma korišćena je mobilna faza toluol : dioksan : sirćetna kiselina (90 : 25 : 4; V/V/V). Na startnu liniju nanošeno je po 20 µl metanolnog rastvora uzorka i standarda.

Nakon prskanja ploče prirodnim reagensom A, vršena je detekcija pod UV svetlom na 366 nm.

HPLC analiza:

Hromatografska analiza je izvršena na aparatu Hewlet Packard Series 1100, na koloni Hypersil ODS RP18, 5 μm , 250 \times 4.6 mm I.D. column, 40 $^{\circ}\text{C}$, petlja 20 μL . Za mobilnu fazu korišćeni su *n*-butanol, metanol i 20 mmol/l KH_2PO_4 (pH 3,15, pomoću *orto* fosforne kiseline) pri zapreminskom odnosu 11:37:52, filtriranjem preko 0,45 μm filter papira (Millipore, Ireland) i degaziranjem pre upotrebe na ultrazvučnom kupatilu. Protok je bio 1 ml/min, a talasna dužina detekcije 366 nm.

Rezultati i diskusija

Literaturni podaci govore o prisustvu polifenola u rodu *Salvia* L. Polarne fenolne kiseline čine glavni deo vodeno rastvornih komponenata dekokta. Glavnina fenolnih kiselina su derivati kafene kiseline koji su karakteristični za žalfiju. Kafena kiselina igra centralnu ulogu u biohemiji familije Lamiaceae, dok je ruzmarinska kiselina glavni fenolni sastojak odgovoran za antioksidantno delovanje [17].

Većina flavonoida su flavoni apigenina i luteolina, ili njihovih odgovarajućih 6-hidroksilovanih derivata. Metiletri flavona su zastupljeni u lišću žalfije ili sekretima nadzemnih delova. Flavonoli su većinom metil etri kamferola i kvercetina. Retusin je identifikovan kod *S. glutinosa* [17].

Rezultati pokazuju da obe biljne vrste sadrže flavonoide (tabela 1). Za *S. officinalis* su karakteristični apigenin i njegovi derivati (Ap-4'-OMe, Scut-6-OMe, Isoscut-8-OMe), luteolin i 6-OH-Lut-6-OMe. Vrstu *S. glutinosa* karakteriše apigenin, luteolin, 6-OH-Lut-6-OMe, Kae-3-OMe, Qu-3,7,3'-triOMe i Qu-3,7,3',4'-tetraOMe. Kafena kiselina je prisutna kod obe biljne vrste i to samo kod materijala koji nije destilovan. Dobijeni rezultati se poklapaju sa literaturnim.

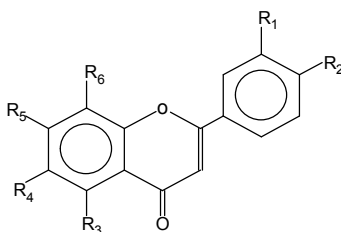
Tabela 1. Flavonoidi u acetonskim ekstraktima *S. officinalis* i *S. glutinosa*

Komponente	<i>S. officinalis</i>		<i>S. glutinosa</i>	
	ND	DE	ND	DE
Apigenin	++	+	++	++
Ap-4'-OMe	++	+		
Scut-6-OMe	++	++		
Isoscut-8-OMe	++	++	+	+
Luteolin	++	++	++	++
6-OH-Lut-6-OMe	++	++	++	++
Kae-3-OMe			++	+
Kae-3,7-diOMe			+	+
Qu-3,7,3'-triOMe			++	+
Qu-3,7,3',4'-tetraOMe			++	+
Caffeic acid	+		+	

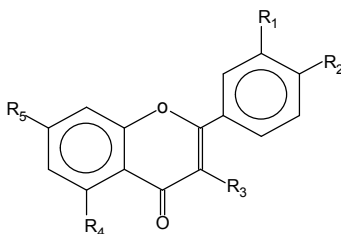
ND - nedestilovana sirovina

DE - destilovana sirovina

Flavoni (trivijalna imena) skraćeno	Flavoni (pun naziv)	Grupa	Semisistematsko ime
Apigenin	Apigenin	$R_1=R_4=R_6=H, R_2=R_3=R_5=OH$	5,7,4'-triOH flavone
Ap-4'-OMe (<i>acacetin</i>)	Apigenin 4'-methyl ether	$R_1=R_4=R_6=H, R_2=OCH_3, R_3=R_5=OH$	5,7-diOH-4'-OMe flavone
Scut-6-OMe (<i>hispidulin</i>)	Scutellarein 6-methyl ether	$R_1=R_6=H, R_2=R_3=R_5=OH, R_4=OCH_3$	5,7,4'-triOH-6- OMe flavone
Isoscut-8-OMe	Isoscutellarein 8-methyl ether	$R_1=R_4=H, R_2=R_3=R_5=OH, R_6=OCH_3$	5,7,4'-triOH-8- OMe flavone
Luteolin	Luteolin	$R_1=R_2=R_3=R_5=OH, R_4=R_6=H$	5,7,3',4'-tetraOH flavone
6-OH-Lut-6-OMe (<i>nepetin</i> ili <i>eupafolin</i>)	6-OH-Luteolin-6-methyl ether	$R_1=R_2=R_3=R_5=OH, R_4=OCH_3, R_6=H$	5,7,3',4'-tetraOH-6- OMe flavone



Flavonoli (trivijalna imena) skraćeno	Flavonoli (pun naziv)	Grupa	Semisistematsko ime
Kae-3-OMe (<i>isokaempferide</i>)	Kaempferol 3-methyl ether	$R_1=H, R_2=R_4=R_5=OH, R_3=OCH_3$	5,7,4'-triOH-3-OMe flavone
Kae-3,7-diOMe (<i>kumatakenin</i>)	Kaempferol 3,7-dimethyl ether	$R_1=H, R_2=R_4=OH, R_3=R_5=OCH_3$	5-OH-3,7-OMe flavone
Qu-3,7,3'-triOMe (<i>pachypodol</i>)	Quercetin 3,7,3'-trimethyl ether	$R_1=R_3=R_5=OCH_3, R_2=R_4=OH$	5,4'-diOH-3,7,3'- triOMe flavone
Qu-3,7,3',4'-tetraOMe (<i>retusin</i>)	Quercetin 3,7,3',4'- tetramethyl ether	$R_1=R_2=R_3=R_5=OCH_3, R_4=OH$	5-OH-3,7,3',4'- tetraOMe flavone



Zaključak

Dobijanje etarskog ulja žalfije hidrodestilacijom koje je dosta cenjeno na tržištu, posebno vrste *S. officinalis*, jedna je od prednosti njene upotrebe. Pored toga, nakon ovog procesa zaostaje biljni materijal kao izvor bioaktivnih supstanci. Očigledno je da rezidualni materijal (DE), iz kojeg je izolovano etarsko ulje, predstavlja pogodan i jeftin izvor flavonoida, a verovatno i drugih grupa jedinjenja.

TLC i HPLC analize pokazuju da on ne mora biti otpad u industriji, već se može dalje tretirati rastvaračima različite polarnosti u cilju izolovanja flavonoida (aglikona ili glikozida) i dalje primene.

Zahvalnica

Rezultati su deo Projekta Ministarstva nauke i zaštite životne sredine (Ev. br. 142073).

Literatura

- [1] F. A. Tomas-Barberan, *Fitoterapia* 57(2) (1986) 67
- [2] M. Weidenbörlen, H. C. Yha, *Mycol. Res.* 98(12) (1994) 1376
- [3] M. J. Abad, P. Bermejo, A. Villar, S. S. Palomia, L. Carasco, *Phytotherapy Research* 11 (1997) 198
- [4] M. C. Recio, R. M. Giner, S. Manez, J. L. Rios, A. Marston, K. Hostettmann, *Phytotherapy Research* 9 (1998) 571
- [5] E. M. Marinova, N. V. Yanishlieva, *Food Chemistry* 58(3) (1996) 245
- [6] A. Kootstra, *Plant Molecular Biology* 26 (1994) 771
- [7] M. J. Messina, *Am. J. Clin. Nutr.* 70(3 Suppl) (1999) 439S
- [8] Arora, A. Valcic, S. Cornejo, M. G. Nair, P. N. Timmermann, *Chem. Res. Toxicol.* 7 (2000) 638
- [9] S. Toda, Y. Shirataki, *Biol. Trace Elem. Res.* 79(1) (2001) 83
- [10] S. Đorđević, M. Cakić, S. Amr, *Facta Universitatis* 1(5) (2000) 87
- [11] L. Liggins, L. J. C. Bluck, S. Runswick, C. Atkinson, A. Coward, S. Bingham, *J. Nutr. Biochem.* 11 (2000) 326
- [12] L. S. Hutabarat, M. Mulholland, H. J. Greenfield, *J. Chromatogr. A* 795 (1998) 377
- [13] L. Liggins, L. J. C. Bluck, A. Coward, S. Bingham, *Anal. Biochem.* 264 (1998) 1
- [14] P. A. Murphy, T. T. Song, G. Buseman, K. Barua, G. R. Beecher, D. Trainer, J. Holden, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 4635
- [15] P. A. Murphy, E. Farmakalidis, L. D. Johnson, *J. Chromatogr.* 211 (1981) 166
- [16] A. P. Griffith, M. W. Collison, *J. Chromatogr. A* 913 (2001) 397
- [17] L. Yinrong, F. Yeap, *Phytochemistry* 59 (2002) 117
- [18] M. K. Valant-Vetschera, N. J. Roitman, E. Wollenweber, *Biochemical Systematics and Ecology* 31 (2003) 1279
- [19] A. Veličković, M. Ristić, D. Veličković, S. Ilić, N. Mitić, *J. Serb. Chem. Soc.* 68(6) (2003) 435
- [20] D. Veličković, M. Ristić, N. Randelović, A. Šmelcerović, *J. Essent. Oil Res.* 14(6) (2002) 453
- [21] D. Veličković, M. Ristić, A. Veličković, *Lek. sirov.* 21(21) (2001) 51
- [22] D. Veličković, M. Ristić, A. Veličković, *J. Essent. Oil Res.* 15(5) (2003) 346
- [23] J. F. Stevens, E. Wollenweber, M. Ivancic, V. Hsu, S. Sundberg, M. Deinzer, *Phytochemistry* 51 (1999) 771
- [24] E. Wollenweber, M. Dorr, J. Roitman, *Z. Naturforsch.* 55 (2000) 5
- [25] Ph. Jug. IV, *Farmakopeja SFRJ, Pharmacopoea Jugoslavica*. Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, Beograd, 1991.

Summary

FLAVONIDS OF GARDEN SAGE (*Salvia officinalis* L.) AND GLUTINOUS SAGE (*Salvia glutinosa* L.)

Scientific paper

Dragan Veličković¹, Milena Nikolova², Stephanie Ivancheva², Vlada Veljković³

¹AD Zdravlje-Actavis, Pharmaceutical and Chemical Industry, Leskovac, Serbia

²Institute of Botany, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

³Faculty of Technology, Leskovac, Serbia

Due to the considerable biological effects of flavonoids (preventive, antioxidative, antimicrobial) this group of compounds was analysed in garden sage (*Salvia officinalis* L.) and glutinous sage (*Salvia glutinosa* L.). The extraction of the dried plants as well as dried residue from which the essential oil was previously isolated was performed with acetone. The TLC and HPLC techniques were used for identification of flavonoids in extracts.

Results show that both plant species contain flavonoids. Apigenin and its derivatives (e.g. apigenin 4'-methyl ether), scutellarein-6-methyl ether, isoscutellarein-8-methyl ether, luteolin and 6-OH-luteolin-6-methyl ether are distinctive for the species *S. officinalis*. Apigenin, luteolin, 6-OH-luteolin-6-methyl ether, kaempferol-3-methyl ether, quercetin-3,7,3'-trimethyl ether and quercetin-3,7,3',4'-tetramethyl ether are distinctive for the species *S. glutinosa*.

It is interesting that the flavonoids were also detected in considerable quantities in the material from which the essential oil was isolated before. It turned out that this material which is an industrial waste may be further used and treated with the solvents of different polarity in order to isolate the flavonoids.

Key words

Salvia officinalis L., *Salvia glutinosa* L., flavonoids, extraction, residue after distillation.