

Obični likovac (*Daphne mezereum* L.) i planinski likovac (*D. alpina* L.): kvalitativna fitokemijska karakterizacija

Jurišić Grubešić, Renata; Maltar, Andrina; Galović, Lea; Kremer, Dario

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2010, 66, 1 - 16**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:893652>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-28**



Repository / Repozitorij:

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



Obični likovac (*Daphne mezereum* L.) i planinski likovac (*D. alpina* L.): kvalitativna fitokemijska karakterizacija

RENATA JURIŠIĆ GRUBEŠIĆ, ANDRINA MALTAR, LEA GALOVIĆ, DARIO KREMER

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 10000 Zagreb, Hrvatska

February *Daphne* (*Daphne mezereum* L.) and Alpine *Daphne* (*D. alpina* L.): qualitative phytochemical characterization

Abstract – In this work qualitative analysis of some bioactive compounds of February *Daphne* (*Daphne mezereum* L.) and Alpine *Daphne* (*D. alpina* L.) was performed. The following bioactive compounds were detected using thin-layer chromatography methods (TLC) in methanolic extracts of leaves, stems and roots: flavonoids, coumarins, phenolic acids, saponins, sterols, triterpenes and triterpenic acids. Qualitative analysis of tannins was performed by general reactions of developing coloured products and sediments. Hydrolysable tannins were detected in all examined extracts, while the reaction with condensed tannins was negative for all investigated specimens.

(Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, A. Kovačića 1, HR-10000 Zagreb, Croatia)

UVOD

Već u začecima razvoja medicine i farmacije ljudi su prepoznali blagodati prirode. Biljke i njihovi pripravci bili su prvi lijekovi. Spoznavanje mehanizama djelovanja lijekova, kao i razvoj suvremenih analitičkih metoda koje omogućuju opsežnu kvalitativnu i kvantitativnu karakterizaciju ljekovitih tvari, pobuđuju znatan interes znanstvenika za još neistražene biljne vrste koje su od davnina poznate po svojem ljekovitom djelovanju. Jedna od njih je i obični likovac (*Daphne mezereum* L., *Thymelaeaceae*).

Obični likovac (slika 1a.–b.) listopadni je grm visine 30–150 cm sa šibolikim, slabo razgranjenim, uspravnim granama. Kora stabljike i grana je u mladosti žućkastozelena, a kasnije sivosmeđa. Duguljasto lancetasti listovi dugi su 7–9 cm, široki 2–5 cm, cjelovita ruba, spiralno raspoređeni, svijetlozeleni, razvijaju se iz jajastih pupova smještenih pri vrhu stabljike i ogranaka. Cvate prije ili za vrijeme listanja, od veljače do travnja. Postrano smješteni cvjetni pupovi su kuglasti, a cvjetovi (slika 1b.) sjedeći, ružičasti, vrlo rijetko bijeli, mirisavi, najčešće po tri zajedno, s produženim cvjetištem i četiri korolinična listića čaške (lapa), dok vjenčić nije razvijen. Plod je duguljasto-jajasta, jarko crvena, jednosjemena



Slika 1a. Obični likovac (*Daphne mezereum* L.)



Slika 1b. Obični likovac (*D. mezereum* L.) – cvijet i mladi listovi

koštunica veličine zrna graška, koja dozrijeva u lipnju i srpnju (slika 1b.). Rasprostranjen je u Europi, na Kavkazu, u Turskoj, sjevernom Iranu te u zapadnom i istočnom Sibiru, gdje raste u svijetlim šumama i šikarama, uz rubove šuma, uz potoke, od brdskog do preplaninskog pojasa (do 2000 m nadmorske visine). U Hrvatskoj ga ima u Lici, Gorskom kotaru, na Velebitu, Žumberku, Medvednici, panonskom gorju, u kordunskoj zaravni i sjeverozapadnoj Hrvatskoj (1–8).

Planinski likovac (slika 2a.–b.) visok je do 50 cm, vrlo razgranjen listopadni grm. Kora mladih grana je crvenkastosmeđe boje, obrasla pahuljastim dlakama, a kasnije siva, gola i fino ispucana. Starije su grane polegle, a mlađe uspravne i pravilno viličasto razgranjene. Sjedeći, obrnuto jajasti do duguljasti, izmjenično smješteni listovi dugi su 2–4 cm, cjelovita ruba, sivozelena, s obje strane svilenkasto dlakavi (barem u početku). Po 4 do 10 cvjetova združeno je u vršne glavičaste cvatove. Cvjetovi su gotovo sjedeći, dugi do 1 cm, bijeli, mirisavi, s četiri korolonična listića čaške duga 2,5–4 mm, dok vjenčić nije razvijen. Cvate nakon listanja u svibnju i lipnju. Plod (slika 2b.) je okruglasto-jajasta, narančastocrvena, slabo dlakava koštunica s jednom sjemenkom. Rasprostranjen je u Europi (Francuska, Italija, Švicarska, Austrija, Slovenija, Hrvatska, Srbija, Bosna i Hercegovina, Crna Gora, možda Španjolska). U Hrvatskoj se može naći na planinskim područjima Velebita, Velike Kapele, Gorskog kotara i Ličke Plješevice. Raste na sunčanim, kamenitim obroncima, u pukotinama vapnenačkih stijena, većinom iznad granice šume (do 1500 m nadmorske visine), ali se na zapadnim obroncima i u klancima spušta mjestimično gotovo do mora (1, 3, 6, 8–9).



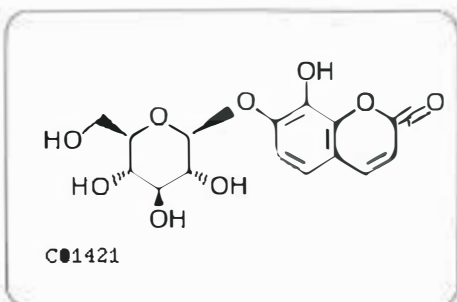
Slika 2a. Planinski likovac (*Daphne alpina* L.) – habitus



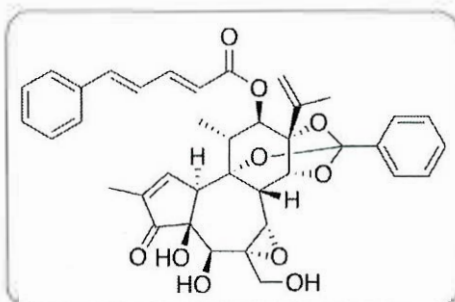
Slika 2b. Planinski likovac (*D. alpina* L.) – list i plod

Svi su biljni dijelovi (osobito kora i plodovi) obiju vrsta otrovni za čovjeka i sisavce općenito te za ribe. Ljekovitost običnog i planinskog likovca najviše se pripisuje kori koja se sabire u proljeće prije cvatnje i suši u trakama širine 0,5–2 cm. Droga Cortex mezerei nekada se koristila u liječenju reume, uloga i kožnih bolesti, bilo kao ekstrakt kore, ili u pripravku Liquor Sarsae compositus concentratus. Zloupotrebljavala se kao abortiv, dok se sada zbog otrovnosti ne primjenjuje u suvremenoj fitoterapiji (10–12).

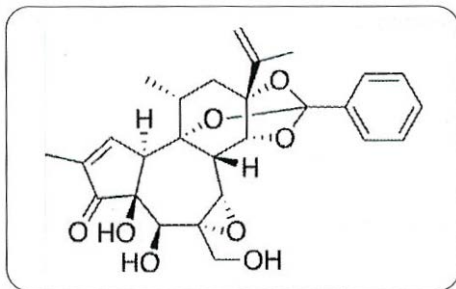
Toksični učinak običnog i planinskog likovca pripisuje se dafninu, mezereinu i dafnetoksinu. Dafnin (slika 3a.) je gorki kumarinski glikozid (7,8-dihidroksikumarin-7- β -D-glukozid), dok su mezerein (slika 3b.) i dafnetoksin (slika 3c.) diterpenske strukture ljutog okusa (5, 10). Dafnin je sredinom 19. stoljeća u kori planinskog likovca otkrio Vauquelin, koji ga je zbog oštrog okusa i kaustičnih svojstava smatrao alkaloidom. No, Zwenger je nešto kasnije dokazao da je riječ o glikozidu koji se sastoji od bezbojnih, prozirnih, prizmatičnih kristala. Taj je glikozid slabo topljiv u hladnoj, a dobro u vrućoj vodi i alkoholu te netopljiv u eteru. Kuhanjem s razrijeđenim kiselinama ili pod utjecajem nekih enzima dafnin se razgrađuje na glukozu i dafnetin, aglikon kumarinske strukture (slika 3d.). Godine 1879. Strunkel je otkrio da je dafnetin dioksikumarin. Suhom destilacijom alkoholnog ekstrakta kore dobiven je izomer dafnetina, umbeliferon. Od kumarinskih se



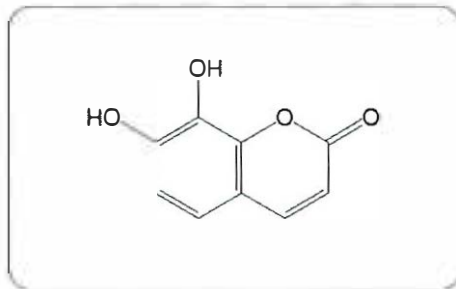
Slika 3a. Dafnin (www.genomead.jp)



Slika 3b. Mezerein (www.axxora.com)



Slika 3c. Dafnetoksin (www.genome.ad.jp)



Slika 3d. Dafnetin

spojeva u vrstama roda likovac (*Daphne* L.) nalaze još i dafnoretin, triumbelin, 7,8-dihidroksi-kromen-2-on i 7-hidroksi-8-metoksikumarin. Od glikozida su, osim dafnina, izolirani također hesperidin i cinhoriin, a od fitosterola – β -sitosterol (12).

Za mezerein je utvrđeno da ima antileukemijsko djelovanje na P-388 limfocitnu leukemiju u miša (12–14). Djeluje i kao aktivator protein kinaze C (PKC) (15). Dafnetin je pokazao značajnu antibakterijsku aktivnost na vrste *Bacillus lentus* i *Escherichia coli*, dok antifungalni učinak nije utvrđen (16). Dafnetin također ima dokazan *in vitro* antimalarični učinak u koncentracijama 25–40 μ M na *Plasmodium falciparum* (17). Analgetski i protuupalni učinak također su ispitivani na dafnetinu i 4-metildafnetinu, a dokazano je da je takvo djelovanje rezultat inhibicije stvaranja leukotricna B4 kao medijatora upale (18).

U okviru ovoga rada provedena je kvalitativna analiza biološki aktivnih spojeva (flavonoida, trjeslovina, kumarina, saponina, triterpenskih spojeva i sterola) u vodeno-alkoholnim ekstraktima lista, stabljike i korijena običnog i planinskog likovca, kao doprinos fitokemijskim istraživanjima roda likovac (*Daphne* L.) i hrvatske flore uopće.

EKSPERIMENTALNI DIO

Biljni materijal

Istraživanju su podvrgnuti na zraku osušeni listovi, stabljika i korijen običnog likovca (*Daphne mezereum* L.) i planinskog likovca (*Daphne alpina* L.), skupljeni u rujnu 2007. godine na području Gornjeg Jelenja, na nadmorskoj visini od oko 850 m. Identifikacija biljnog materijala i utvrđivanje morfoloških obilježja provedeni su na Zavodu za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, usporedbom s dostupnim literaturnim podacima (1, 3, 8).

Kvalitativna analiza flavonoida

Kvalitativna analiza flavonoida provedena je metodom kromatografije na tankom sloju (TLC). Biljni su uzorci pripremljeni pojedinačnom ekstrakcijom 0,1 g praškaste droge (listovi, stabljika i korijen) s po 2 mL metanola, tijekom 10 minuta na vodenoj kupelji (60 °C). Ispitivanje prisutnosti flavonoida provedeno je na tankom sloju Kieselgela 60 F₂₅₄, u mobilnoj fazi sastavljenoj od smjese otapala: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena

kiselina - voda (100:11:11:27, V/V). Nakon prskanja Naturstoff-reagensom i 5%-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000 (NST/PEG), kromatogrami su promatrani pod UV svjetlom na valnoj duljini od 365 nm (19). Kao poredbene tvari primijenjene su 0,05%-tne metanolne otopine flavonoida kvercetina, hiperozida, naringenina i naringina.

Kvalitativna analiza kumarina

Dokazivanje kumarina provedeno je metodom tankoslojne kromatografije i kemijskom reakcijom s 1 M natrijevim hidroksidom. TLC analiza kumarina provedena je u prethodno opisanom kromatografskom sustavu za dokazivanje flavonoida, uz detekciju na UV-254 nm i UV-365 nm. Kemijska reakcija dokazivanja kumarina provedena je tako da je po 0,2 g pulveriziranih listova, stabljika i korijena izmućkano s 5 mL 70%-tnog metanola i filtrirano. Filtrati su potom zalučeni s nekoliko kapi 1 M natrijeva hidroksida i promatrani pod UV svjetlom na valnoj duljini od 365 nm. Žutozelena fluorescencija ukazuje na prisutnost kumarinskih spojeva.

Kvalitativna analiza trjeslovina

Priprava ekstrakta

U prah je samljeveno po 0,5 g listova, stabljika i korijena te pojedinačno ekstrahirano 15 minuta s po 50 mL destilirane vode, u tikvici s povratnim hladilom, u kipućoj vodenoj kupelji. Ohlađeni ekstrakti su profiltrirani i primijenjeni u ispitivanjima koja slijede.

Opće reakcije s metalnim solima i želatinom

1. Dvije kapi 5%-tne otopine željezova(III) klorida dodaju se u 2 mL filtrata.
2. U 2 mL filtrata dodaju se 2–3 kapi 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata.
3. U 5 mL filtrata doda se 0,5 mL 10%-tne otopine olovova acetata.
4. U 2 mL filtrata uliju se 2 mL 1%-tne otopine želatine.

Dokazivanje kondenziranih trjeslovina

U 6 mL pojedinog biljnog ekstrakta doda se po 3 kapi otopine formaldehida i 6 kapi 10%-tne klorovodične kiseline. Sadržaj se ugrije do vrenja, ohladi i profiltrira, a potom se filtar papir ispere s 1 mL tople vode. Dokaz kondenziranih trjeslovina predstavlja talog na filtar papiru koji je netopljiv u toploj 5%-tnoj otopini kalijeva hidroksida.

Dokazivanje trjeslovina koje hidroliziraju

U 5 mL filtrata, dobivenog u prethodnoj reakciji taloženja kondenziranih trjeslovina s formaldehidom i klorovodičnom kiselinom, doda se 1 g natrijeva acetata (bez potresiivanja epruvete), a zatim 1 mL 1%-tne otopine željezova(III) amonijeva sulfata. U prisutnosti trjeslovina koje hidroliziraju javlja se ljubičasti prsten na mjestu prikladnog pH.

Kvalitativna analiza saponina i triterpena

Dokazivanje saponina i triterpena provedeno je metodom tankoslojne kromatografije. Metanolni ekstrakti pripreme se pojedinačnom ekstrakcijom 1 g pulveriziranih listova, stabljike i korijena s po 10 mL 70%-tnog metanola na vodenoj kupelji, uz povratno hladilo,

u trajanju od 30 minuta. Bistri se filtrati upare do suha, a ostatak otopi u malo metanola. Po 20 μ L metanolne otopine nanese se na tanki sloj adsorbensa Kieselgela 60 F₂₅₄. Odjeljivanje pojedinačnih tvari postiže se pomoću mobilne faze u sastavu: kloroform – metanol – voda (64:50:10, V/V), a njihova se detekcija provodi prskanjem kromatograma reagensom (5 mL klorsulfonske kiseline i 10 mL ledene octene kiseline pomiješa se uz oprezno hlađenje), te grijanjem kromatograma nekoliko minuta na 105 °C (19).

Kvalitativna analiza sterola i triterpenskih kiselina

Metanolni ekstrakti lista, stabljike i korijena, pripremljeni prethodno opisanim postupkom ekstrakcije saponina, podvrgnu se kromatografskom odjeljivanju na tankom sloju. Kao stacionarna faza primijeni se adsorbens Kieselgel 60 F₂₅₄, a kao mobilna faza benzen i aceton u omjeru 9:1 (V/V). Detekcija sterola i triterpenskih kiselina provodi se prskanjem kromatograma klorsulfonskom kiselinom, uz zagrijavanje nekoliko minuta na 105 °C (19).

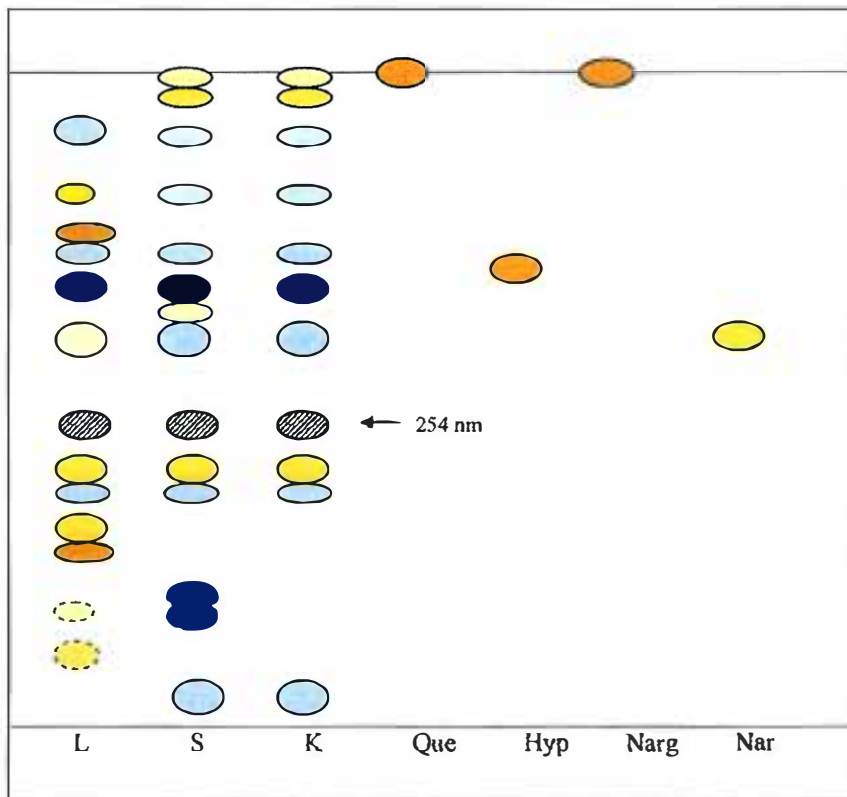
REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati kvalitativne analize flavonoida i kumarina

Standardne otopine kvercetina, hiperozida, naringenina i naringina, te ispitivani metanolni ekstrakti listova, stabljike i korijena običnog i planinskog likovca analizirani su primjenom TLC metode na tankom sloju Kieselgela 60 F₂₅₄, uz razvijач etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V). Detekcija je provedena prskanjem s NST/PEG reagensom, nakon čega su kromatogrami vizualizirani pod UV svjetlom na 254 nm i 365 nm.

U uzorcima običnog i planinskog likovca ne može se sa sigurnošću potvrditi prisutnost primijenjenih poredbenih flavonoida, no na osnovi boje fluorescencije i odgovarajućih R_f vrijednosti može se pretpostaviti da narančaste zone pripadaju flavonoidnim spojevima, a plave zone spojevima kumarinske strukture i fenolnim kiselinama. Dobiveni kromatogrami flavonoidnih i srodnih tvari iz običnog i planinskog likovca prikazani su na slici 4a. i 4b., a pripadajuće R_f vrijednosti kromatografskih mrlja donosi tablica 1.

Za obični likovac (*D. mezereum*) uočena je velika sličnost među kromatogramima ekstrakata stabljike i korijena, gdje je postignuto razdvajanje većeg broja plavo obojenih zona različitih intenziteta, što ukazuje na veću raznolikost spojeva kumarinske strukture u tim biljnim dijelovima u odnosu na list. Kromatogram ekstrakta stabljike običnog likovca bogatiji je od ostalih ekstrakata te biljne vrste za 3 plave zone, s pripadajućim R_f vrijednostima 0,19; 0,23 i 0,55 (slika 4a., tablica 1.). Suprotno tome, na kromatogramu ekstrakta lista nisu uočene plave zone u području nižih R_f vrijednosti, niti dvije narančaste zone koje su za ostala dva ekstrakta detektirane gotovo na frontu kromatograma. No, u listu su detektirane flavonoidne komponente kojih nema u stabljici i korijenu. To su narančaste zone R_f vrijednosti 0,13; 0,21; 0,27; 0,31; 0,52; 0,65 i 0,70. Sukladno literaturnim podacima (20), koji za isti TLC sustav na R_f = 0,64 detektiraju klorogensku kiselinu, može se pretpostaviti da bi plavo obojene zone prisutne na kromatogramima svih



Slika 4a. Kromatogram flavonoida u metanolnim ekstraktima listova (L), stabljike (S) i korijena (K) običnog likovca (*Daphne mezereum* L.).

Stacionarna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄;

Mobilna faza: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V);

Detekcija: NST/PEG i UV-365 nm/254 nm;

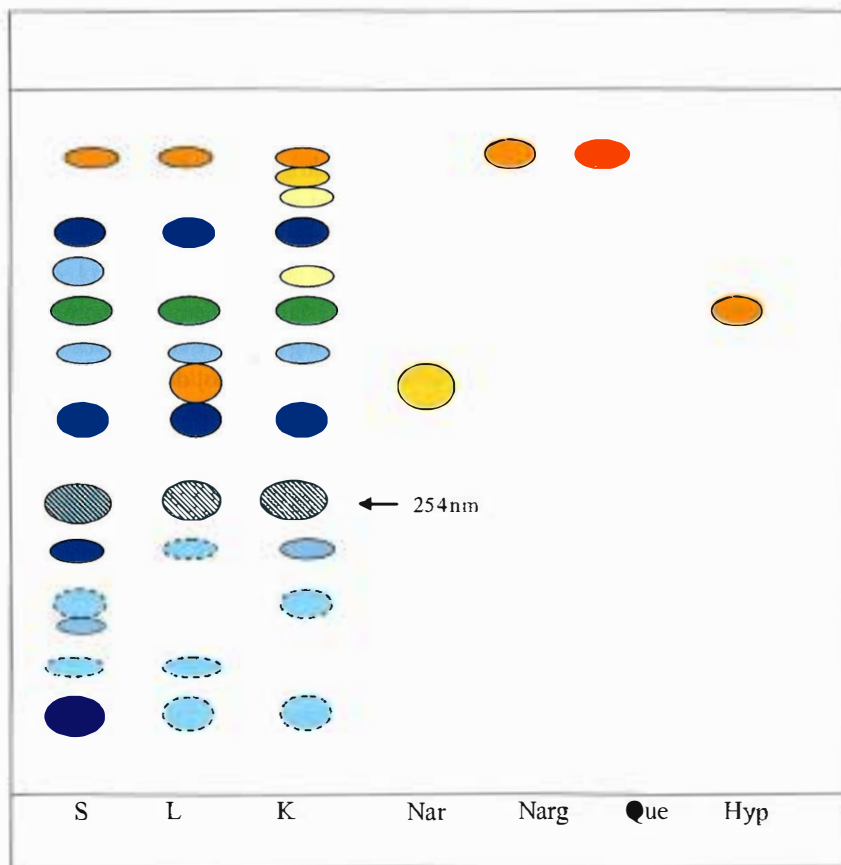
Poredbene tvari: kvercetin (Que), hiperozid (Hyp), naringenin (Narg) i naringin (Nar).

ekstrakata u području oko te R_f vrijednosti mogle pripadati upravo klorogenskoj kiselini. Isti literaturni izvor srodnu kavenu kiselinu detektira kao svijetloplavu zonu na $R_f = 0,79$, no ona nije detektirana u ispitanim biljnim uzorcima. Svijetloplave zone na $R_f = 0,90$ uočene su na kromatogramima svih ekstrakata, a prema boji i položaju mogle bi odgovarati kumarinskoj kiselini, koja se u literaturi (19) navodi kao svijetloplava mrlja s R_f vrijednošću 0,92. S obzirom na to da su kumarinski spojevi veoma zastupljeni u uzorcima običnog likovca, kromatogram je promatran i pod UV svjetlom na 254 nm, gdje je kod svih ispitanih uzoraka uočeno, za kumarine karakteristično, gašenje fluorescencije na $R_f = 0,43$. Zone gašenja fluorescencije prikazane su kromatogramom na slici 4a., a pripadajuće R_f vrijednosti u tablici 1.

Tablica 1. R_f vrijednosti kromatografskih mrlja ekstrakata listova, stabljike i korijena običnog likovca (*Daphne mezereum* L.) i planinskog likovca (*D. alpina* L.), te metanolnih otopina poredbenih tvari: kvercetina (Que), hiperozida (Hyp), naringenina (Narg) i naringina (Nar), u razvijaju etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V).

	List	Stabljika	Korijen	Que	Hyp	Narg	Nar
<i>Daphne mezereum</i> L. b = 15cm							
	R_f	R_f	R_f	R_f	R_f	R_f	R_f
1	0,13	0,04	0,04				
2	0,21	0,19	0,35				
3	0,27	0,23	0,39				
4	0,31	0,35	0,43 (254 nm)				
5	0,33	0,39	0,51				
6	0,37	0,43 (254 nm)	0,57				0,53
7	0,43 (254 nm)	0,51	0,63		0,61		
8	0,52	0,55	0,69				
9	0,57	0,57	0,90				
10	0,62	0,63	0,94			0,99	
11	0,65	0,69	0,98	0,99			
12	0,70	0,90					
13	0,90	0,94					
14		0,98					
<i>Daphne alpina</i> L. b = 14,5 cm							
	R_f	R_f	R_f	R_f	R_f	R_f	R_f
1	0,14	0,14	0,14				
2	0,24	0,25	0,33	0,55	0,99	0,99	0,65
3	0,36	0,28	0,36				
4	0,43(254 nm)	0,32	0,43(254 nm)				
5	0,52	0,36	0,52				
6	0,55	0,43(254 nm)	0,59				
7	0,59	0,52	0,64				
8	0,64	0,59	0,69				
9	0,79	0,64	0,79				
10	0,97	0,72	0,89				
11		0,80	0,93				
12		0,98	0,97				

Na kromatogramu ekstrakta stabljike planinskog likovca postignuto je razdvajanje većeg broja plavo obojenih zona različitih intenziteta, što ukazuje i na veću raznolikost spojeva kumarinske strukture u tom biljnom organu. Kromatogram ekstrakta stabljike



Slika 4b. Kromatogram flavonoida u metanolnim ekstraktima listova (L), stabljike (S) i korijena (K) planinskog likovca (*Daphne alpina* L.).

Stacionarna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄;

Mobilna faza: etil acetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27, V/V);

Detekcija: NST/PEG i UV-365 nm/254 nm;

Poredbene tvari: kvercetin (Que), hiperozid (Hyp), naringenin (Narg) i naringin (Nar).

bogatiji je od ostalih ekstrakata te biljne vrste za dvije plave zone s R_f vrijednostima 0,28 i 0,72. Na kromatogramu ekstrakta korijena uočavaju se tri narančastožute zone (R_f vrijednosti 0,69; 0,89 i 0,93), vjerojatno flavonoidnog podrijetla. Nepolarnim aglikonima, kvercetinu i/ili naringenin, odgovaraju narančaste zone R_f vrijednosti 0,99, detektirane u sva tri ispitana ekstrakta planinskog likovca. U listu nisu detektirane značajne količine flavonoidnih komponenata koje bi se na kromatogramu uočavale kao narančaste zone. Jedino se ističe narančasta mrlja R_f vrijednosti 0,55 koje nema u ekstraktu stabljike i korijena. Ta zona odgovara R_f vrijednosti poredbene otopine naringina, iako se odlikovala intenzivnijom narančastom bojom od standarda. Sukladno literaturnim podacima (20),

koji za isti TLC sustav na $R_f = 0,64$ detektiraju plavu zonu klorogenske kiseline, pretpostavljamo da bi plavozelene mrlje prisutne na kromatogramima svih ekstrakata planinskog likovca u području te R_f vrijednosti mogle pripadati upravo klorogenskoj kiselini. Srodnu kavenu kiselinu isti autori detektiraju kao svijetloplavu zonu na $R_f = 0,79$, što je također potvrđeno u sva tri ispitana ekstrakta planinskog likovca. Kromatogram je promatran i pod UV svjetlom na 254 nm, gdje je u svim ispitivanim ekstraktima uočeno gašenje fluorescencije na $R_f = 0,43$ koje karakterizira prisutnost spojeva kumarinske strukture (slika 4b., tablica 1.).

Dodatna potvrda prisutnosti kumarina dobivena je zaluživanjem metanolno-vodenih ekstrakata (70:30, V/V) lista, stabljike i korijena običnog i planinskog likovca s 1 M natrijevim hidroksidom i promatranjem pod UV svjetlom na valnoj duljini od 365 nm. U svim je ekstraktima uočena intenzivna žutozelena fluorescencija (dokaz kumarina).

Rezultati kvalitativne analize trjeslovina

Prisutnost trjeslovina u vodenim ekstraktima listova, stabljike i korijena običnog i planinskog likovca dokazana je općim reakcijama s metalnim solima i želatinom.

Dodatkom željezova(III) klorida nastala je smeđa boja u ekstraktima lista i stabljike običnog likovca, dok se u ekstraktu korijena uz smeđu boju javilo i замуćenje. S istim je reagensom u ekstraktu lista planinskog likovca nastalo tamnozeleno, u ekstraktu stabljike svijetlozeleno, a u ekstraktu korijena smeđe obojenje. U reakciji sa željezovim(III) amonijevim sulfatom uočeno je zelenosmeđe obojenje u ekstraktu listova običnog likovca, a u ekstraktima stabljike i korijena iste vrste nastala je zelenosmeđa boja i blago замуćenje; isti je reagens dao maslinastozeleno obojenje s trjeslovinama u ekstraktu lista planinskog likovca, svijetlozeleno u ekstraktu stabljike, dok se u ekstraktu korijena razvila smeđa boja. U tim su reakcijama uočena slabije izražena obojenja nego sa željezovim(III) kloridom.

Nakon dodatka olovova acetata, u svim je ekstraktima nastao pahuljast narančast talog, koji je bio intenzivniji u ekstraktima stabljike i korijena običnog likovca te u ekstraktima lista i korijena planinskog likovca. Vrlo slabo замуćenje svih ispitanih uzoraka (nešto jače kod ekstrakta korijena) nastalo je u reakciji sa želatinom. Dodatkom formaldehida i klorovodične kiseline primijećeno je zelenkasto замуćenje u vodenim ekstraktima stabljike i korijena, a plavoljubičasti prsten pojavio se u svim analiziranim uzorcima nakon dodatka natrijeva acetata i željezova(III) amonijeva sulfata.

Opisanim je reakcijama dokazana prisutnost trjeslovina u svim analiziranim ekstraktima, ali su reakcije bile intenzivnije za ekstrakte stabljike i korijena običnog likovca, odnosno za ekstrakte listova i korijena planinskog likovca (pretpostavka većeg udjela ispitivanih tvari). Trjeslovine koje hidroliziraju dokazane su također u svim uzorcima, dok se prisutnost kondenziranih trjeslovina ne može potvrditi.

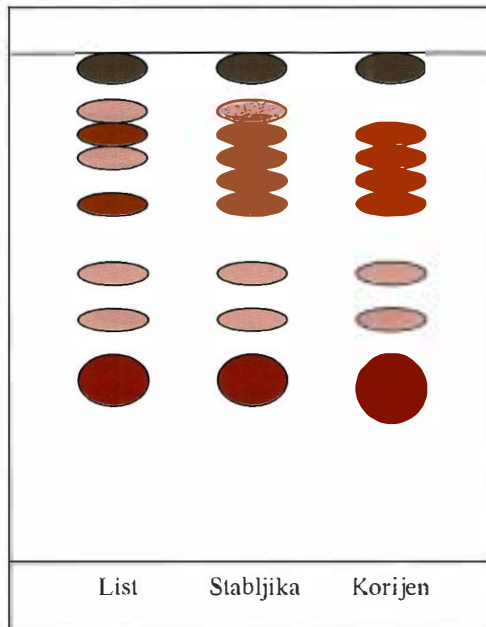
Rezultati kvalitativne analize saponina i triterpena

Metanolni ekstrakti listova, stabljike i korijena običnog i planinskog likovca analizirani su metodom tankoslojne kromatografije. Odjeljivanje tvari postignuto je na tankom sloju

adsorbensa Kieselgela 60 F₂₅₄, u mobilnoj fazi: kloroform – metanol – voda (64:50:10, V/V). Detekcija razvijenih kromatografskih zona provedena je prskanjem klorosulfonskom kiselinom i zagrijavanjem na 105 °C. Dobiveni kromatogrami prikazani su na slici 5a. i 5b., a pripadajuće R_f vrijednosti u tablici 2.

Većina analiziranih tvari zastupljena je u svim ekstraktima običnog likovca. Saponinska komponenta R_f vrijednosti 0,81 nije dokazana samo u ekstraktu listova, a komponenta R_f vrijednosti 0,92 nije detektirana jedino u ekstraktu korijena. U sva tri ekstrakta prisutna je kromatografska mrlja R_f vrijednosti 0,87, no u ekstraktu listova njezina je boja znatno drugačija pa se može pretpostaviti da je riječ o različitim spojevima. Veličinom kromatografske zone i intenzivnom ljubičastosmeđom bojom na kromatogramima se posebno ističe saponinska tvar R_f vrijednosti 0,38. U ovom kromatografskom sustavu triterpenske kiseline putuju relativno visoko pa se prema boji kromatografskih mrlja može pretpostaviti da zone visoke R_f vrijednosti (R_f = 0,92 za ekstrakte lista i stabljike) pripadaju ursolnoj i/ili oleanolnoj kiselini (slika 5a., tablica 2.).

Saponinske komponente dokazane su i u svim ekstraktima planinskog likovca kao smeđe i ljubičastosmeđe zone: stabljika (R_f = 0,40 i 0,63), list (R_f = 0,39 i 0,59), te korijen (R_f = 0,39 i 0,63). Prema literaturnim podacima (21), triterpenske kiseline, oleanolna i



Slika 5a. Kromatogram saponina i triterpena u metanolnim ekstraktima listova, stabljike i korijena običnog likovca (*Daphne mezereum* L.).

Stacionarna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄;

Mobilna faza: kloroform – metanol – voda (64:50:10, V/V);

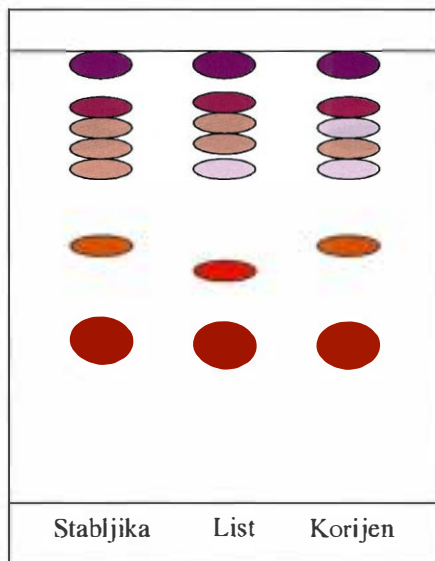
Detekcija: klorosulfonska kiselina, zagrijavanje na 105 °C.

Tablica 2. R_f vrijednosti kromatografskih mrlja ekstrakata listova, stabljike i korijena običnog likovca (*Daphne mezereum* L.) i planinskog likovca (*D. alpina* L.) u razvijajuću kloroform – metanol – voda, 64:50:10 (V/V).

		<i>Daphne mezereum</i> L.								
b = 6,2 cm		1	2	3	4	5	6	7	8	9
List		0,38	0,52	0,68	0,77	0,84	0,87	0,92	0,97	
Stabljika	R_f	0,38	0,52	0,68	0,77	0,81	0,84	0,87	0,92	0,97
Korijen		0,38	0,52	0,68	0,77	0,81	0,84	0,87	0,97	

		<i>Daphne alpina</i> L.								
b = 5,7 cm		1	2	3	4	5	6	7	8	9
List		0,39	0,59	0,75	0,79	0,83	0,88	0,98		
Stabljika	R_f	0,40	0,63	0,77	0,81	0,84	0,88	0,97		
Korijen		0,39	0,63	0,74	0,79	0,83	0,88	0,98		

ursolna kiselina, imaju R_f vrijednost 0,89 u navedenom kromatografskom sustavu. Dakle, može se pretpostaviti da se detektirane ljubičaste zone ($R_f = 0,88$) u sva tri ispitana ekstrakta planinskog likovca odnose upravo na oleanolnu i/ili ursolnu kiselinu (slika 5b., tablica 2.).



Slika 5b. Kromatogram saponina i triterpena u metanolnim ekstraktima listova, stabljike i korijena planinskog likovca (*Daphne alpina* L.).

Stacionarna faza: Kieselgel 60 F_{254} ;

Mobilna faza: kloroform – metanol – voda (64:50:10, V/V);

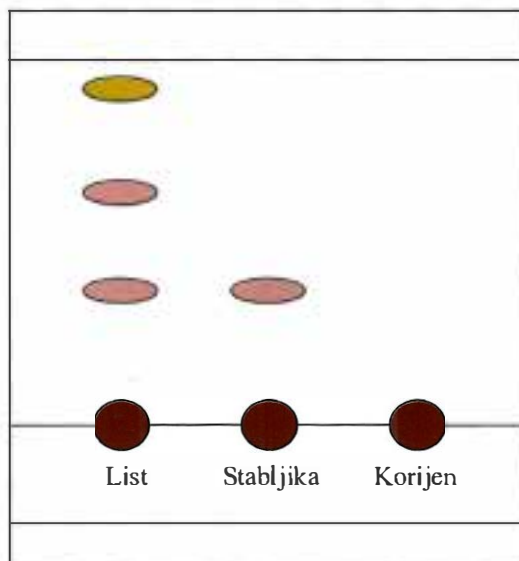
Detekcija: klorsulfonska kiselina, zagrijavanje na 105 °C.

Rezultati kvalitativne analize sterola i triterpenskih kiselina

Metanolni ekstrakti listova, stabljike i korijena običnog likovca analizirani su na tankom sloju adsorbensa Kieselgela 60 F₂₅₄, u mobilnoj fazi benzen – aceton (9:1, V/V). Detekcija sterola i triterpenskih kiselina provedena je prskanjem kromatograma klorsulfonskom kiselinom, uz zagrijavanje nekoliko minuta na 105 °C. Dobiveni kromatogrami prikazani su na slici 6a. i 6b., a pripadajuće R_f vrijednosti u tablici 3.

Na kromatogramu dobivenom za obični likovac ističu se hidrofilne smeđe zone koje su zaostale na startnoj liniji (vjerojatno šećerne komponente). Osim te mrlje, kromatografiranjem ekstrakta korijena iste vrste nije dokazana niti jedna druga sastavnica. Ekstrakti stabljike i listova običnog likovca na položaju R_f = 0,33 pokazuju ljubičastosmeđu zonu, dok su u ekstraktu listova detektirane još dvije komponente: zona s R_f vrijednošću 0,47 mogla bi prema literaturnim podacima (21) odgovarati β-sitosterolu i/ili stigmasterolu, čiji je R_f u ovom sustavu 0,45; također je uočena jedna vrlo lipofilna komponenta u ekstraktu listova običnog likovca kojoj pripada R_f vrijednost 0,96 (slika 6a., tablica 3.).

Na kromatogramu planinskog likovca, kao i u slučaju običnog likovca, na startnoj su liniji zaostale hidrofilne smeđe zone u sva tri ekstrakta. Na kromatogramu ekstrakta lista uočene su još dvije mrlje: na R_f vrijednosti 0,13 detektirana je svijetlosmeđa zona nepoznatog podrijetla, dok je na položaju R_f = 0,47 zabilježena svijetloljubičasta zona koja



Slika 6a. Kromatogram sterola i triterpenskih kiselina u metanolnim ekstraktima listova, stabljike i korijena običnog likovca (*Daphne mezereum* L.).

Stacionarna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄;

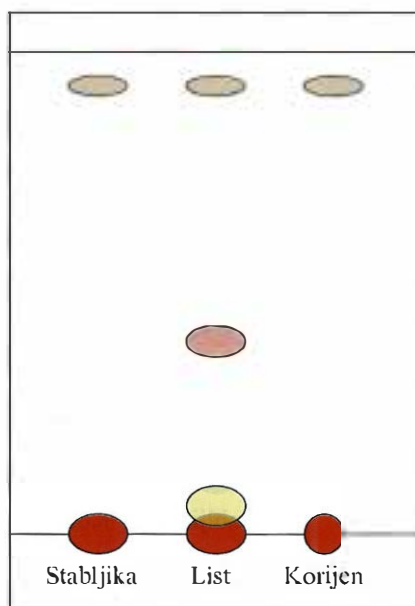
Mobilna faza: benzen – aceton (9:1, V/V);

Detekcija: klorsulfonska kiselina, zagrijavanje na 105 °C.

Tablica 3. R_f vrijednosti kromatografskih mrlja ekstrakata listova, stabljike i korijena običnog likovca (*Daphne mezereum* L.) i planinskog likovca (*D. alpina* L.) u razvijaju benzenu acetom (9:1, V/V).

		<i>Daphne mezereum</i> L.			
b = 7,0 cm		1	2	3	4
List		0,0	0,33	0,47	0,96
Stabljika	R_f	0,0	0,33		
Korijen		0,0			
		<i>Daphne alpina</i> L.			
b = 5,3 cm					
List		0,0	0,13	0,47	0,93
Stabljika	R_f	0,0			0,93
Korijen		0,0			0,93

prema literaturnim podacima (21) odgovara β -sitosterolu i/ili stigmasterolu. Osim toga, u sva su tri ekstrakta planinskog likovca detektirane jako lipofilne komponente, koje su zabilježene kao ljubičastomeđe zone na položaju $R_f = 0,93$ (slika 6b., tablica 3.).



Slika 6b. Kromatogram sterola i triterpenskkih kiselina u metanolnim ekstraktima listova, stabljike i korijena planinskog likovca (*Daphne alpina* L.).
 Stacionarna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄;
 Mobilna faza: benzen – acetom (9:1, V/V);
 Detekcija: klorosulfonska kiselina, zagrijavanje na 105 °C.

ZAKLJUČAK

Primjenom metode tankoslojne kromatografije (TLC) dokazana je prisutnost flavonoidnih i kumarinskih spojeva u metanolnim ekstraktima listova, stabljike i korijena običnog likovca (*Daphne mezereum*) i planinskog likovca (*D. alpina*). U uzorcima običnog likovca detektirano je ukupno 10 različitih narančastih kromatografskih zona koje pripadaju flavonoidnim sastavnicama i 9 plavih zona raličitog intenziteta (fenolne kiseline i kumarinski spojevi). S obzirom na broj i intenzitet obojenih kromatografskih zona, može se zaključiti da su listovi običnog likovca bogatiji flavonoidnim sastavnicama negoli stabljika i korijen. Za planinski je likovac ukupno detektirano 5 različitih narančastih kromatografskih zona (flavonoidi) i 10 plavih zona raličitog intenziteta (kumarinski spojevi i fenolne kiseline).

Prisutnost kumarinskih spojeva također je dokazana u svim ekstraktima običnog i planinskog likovca, karakterističnim gašenjem fluorescencije pripadajućih kromatografskih zona pod UV svjetlom na 254 nm, kao i izravnim promatranjem zaluženih metanolno-vodenih ekstrakata pod UV svjetlom na 365 nm. Općim reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga u svim su ekstraktima običnog i planinskog likovca dokazane trjeslovine. Pritom je potvrđena prisutnost trjeslovina koje hidroliziraju, dok je reakcija na kondenzirane trjeslovine bila negativna.

Metodom tankoslojne kromatografije potvrđena je također prisutnost saponinskih i triterpenskih tvari u obje istraživane vrste. Prema boji i R_f vrijednosti detektiranih zona u ekstraktima listova i stabljike običnog likovca dokazane su ursolna i oleanolna kiselina. Obje kiseline dokazane su i u sva tri ispitana ekstrakta planinskog likovca.

Tankoslojnom kromatografijom također su razdvojeni steroli od triterpenskih kiselina i dokazana prisutnost β -sitosterola i/ili stigmasterola u obje analizirane biljne vrste.

Dosadašnja znanstvena istraživanja običnog i planinskog likovca obznanila su veliku raznolikost biološki aktivnih tvari te time i njihov znatan fitoterapijski potencijal, napose u grupi kumarinskih spojeva. Rezultati dobiveni u okviru ovoga rada potvrđuju suvremeni status spomenutih biljnih vrsta te predstavljaju doprinos fitokemijskim istraživanjima roda likovac (*Daphne* L.). Budući da je obični likovac još u prošlosti zauzimao značajno mjesto u pučkoj medicini, brzim razvojem suvremene fitoterapije i uvođenjem novih analitičkih metoda, te potaknuti medicinskim otkrićima (posebice u području citotoksičnih lijekova), uskoro bi se mogla očekivati nova znanstvena istraživanja i zanimljiva saznanja o bioaktivnim tvarima i biološkim učincima ove nadasve zanimljive biljne vrste i njezinih srodnica.

Literatura – References

1. D. A. Webb, I. K. Ferguson, *Daphne* L., In: T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burgess, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb (eds.), *Flora Europaea*, Vol. 2: *Rosaceae* to *Umbelliferae*, Cambridge University Press, Cambridge-London-New York-Melbourne 1968, 256.
2. M. Pahlow, *Velika knjiga ljekovitog bilja*, Cankarjeva založba, Ljubljana - Zagreb 1989, 174.

3. S. Forenbacher, Velebit i njegov biljni svijet, Školska knjiga Zagreb 1990, 496.
4. S. Forenbacher, Žumberak: kalendar flore Žumberačke gore, Školska knjiga d.d. Zagreb 1995, 342.
5. M. Crvenka, Atlas otrovnog bilja, Svjetlo riječi Livno 1996, 27.
6. W. Erhardt, E. Götz, N. Bödeker, S. Seybold, Zander – Handwörterbuch der Pflanzennamen, Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart 2002, 353.
7. I. Sočo, T. Nikolić, V. Hršak, S. Jelaska, M. Plazibat, Nat. Croat. **11** (2002) 225.
8. Č. Šilić, Atlas dendroflora (drveće i grmlje) Bosne i Hercegovine, Matica hrvatska Čitluk, Široki Brijeg 2005, 362, 372.
9. J. Herman, Šumarska dendrologija, Stanbiro, Zagreb 1971, 388.
10. F. Kušan, Ljekovito i drugo korisno bilje, Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb 1956, 311.
11. V. Videk, 1960, Ljekovito bilje Jugoslavije, Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb, 1960, 90.
12. N. Ullah, Phytochemical investigation of *Daphne oleoides*, PhD thesis, University of Karachi, Karachi 1999, 66.
13. S. M. Kupchan, R. L. Baxter, Science **187** (1975) 652.
14. A. Ulubelen, T. Bülent, T. Ertan, J. Nat. Prod. **49** (1986) 692.
15. L. Saraiva, P. Fresco, E. Pinto, H. Portugal, J. Goncalves, Planta medica **67** (2001) 787.
16. F. Cottiglia, G. Loy, D. Garau, C. Floris, M. Caus, R. Pompei, L. Bonsignore, **8** (2001) 302.
17. Y.-Z. Yang, A. Ranz, H.-Z. Pan, Z.-N. Zhang, X.-B. Lin, S. R. Meshnick, A. J. Trop. Med. Hyg. **46** (1992) 15.
18. J. R. S. Hoult, R. A. Forder, B. Heras, I. B. Lobo, M. Payá, Agents Actions **42** (1994) 44.
19. H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski, Drogenanalyse, Springer Verlag, Berlin – Heidelberg – New York 1983, 163.
20. G. S. Četković, S. M. Dilas, J. M. Čanadanović Brunet, V. Tumbas, Acta Periodica Technol. **34** (2003) 93.
21. R. Jurišić, Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2003, 99.

Primljeno 27. studenoga 2009.