

# Fitokemijsko istraživanje velevjetnog kukurijeka - *Helleborus niger* L. subsp. *macranthus* (Freyn) Schiffner

---

Maleš, Željko; Plazibat, Miško

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 1999, 55, 265 - 279**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:498917>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**



Repository / Repozitorij:

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



## Fitokemijsko istraživanje velevjjetnog kukurijeka – *Helleborus niger* L. subsp. *macranthus* (Freyn) Schiffner

ŽELJAN MALEŠ<sup>1</sup> i MIŠKO PLAZIBAT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zavod za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb i <sup>2</sup>Botanički zavod Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

### Phytochemical investigation of *Helleborus niger* L. subsp. *macranthus* (Freyn) Schiffner

**S u m m a r y** – Flavonoids (isoquercitrin, other derivatives of quercetin and derivatives of kaempferol) and phenolic acids were proved in the methanolic extracts of leaves and flowers of *Helleborus niger* L. subsp. *macranthus* (Freyn) Schiffner by means of thin-layer chromatography. Quantitative analysis of flavonoids gave a total content of 0.43% in leaves and 0.69% in flowers. Pyrogallol tannins were proved in the aqueous extracts of leaves and flowers upon the colours and precipitates with metallic salts and gelatine. The results of the spectrometric determination showed that leaves contain 4.38% total polyphenols and 0.38% tannins, whereas flowers contain 5.40% total polyphenols and 0.54% tannins.

(<sup>1</sup>Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia, and <sup>2</sup>Department of Botany, Faculty of Science, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia).

### UVOD

*Helleborus niger* L. subsp. *macranthus* (Freyn) Schiffner – velevjjetni kukurijek zeljasta je trajnica iz porodice žabnjaka (*Ranunculaceae*). Biljka pripada ilirskom flornom elementu i kod nas najčešće raste u pretplaninskom području gorske Hrvatske, dok se manji izdvojeni dijelovi areala nalaze na Samoborskom gorju, Žumberku, Medvednici i Papuku, zatim se javlja u Sloveniji te u predalpskom području u Italiji.

Raste na dolomitnoj podlozi, na neutralnim ili slabo bazičnim, propusnim i suhim tlima, u različitim tipovima bukovih, jelovih, borovih, smrekovih kao i nekih drugih šuma, a kadikad, premda rijetko, i na staništima izvan šuma.

U literaturi nisu pronađeni podaci o uporabi te biljne svojte, međutim postoje brojni podaci o uporabi crnog kukurijeka – *Helleborus niger* L. Kako je velevjjetni kukurijek podvrsta crnog kukurijeka, oni su međusobno morfološki veoma slični, a vjerojatno imaju i sličan kemijski sastav. Na osnovu toga moglo bi se pretpostaviti da bi se velevjjetni kukurijek mogao primijeniti u iste svrhe kao i crni kukurijek. Međutim, kemijski sastav velevjjetnog kuku-

rijeka još nije dovoljno istražen da bi se ta pretpostavka mogla smatrati ispravnom. Zato je i cilj naših istraživanja bila kvalitativna i kvantitativna analiza flavonoida i trjeslovina u listovima i cvjetovima navedene biljne svojte.

Velevjetni kukurijek jedna je od dviju podvrsta crnog kukurijeka (1–4). Najčešće upotrebljavani sinonimi za tu biljku su *H. macranthus* (Freyn) Gürke (5) i *H. niger* L. var. *macranthus* Freyn (6).

Ta podvrsta ima uže područje rasprostranjenosti od crnog kukurijeka. Dosta je rijetka (5) i manje dostupna biljka te je malo istraživana. Za nju postoji samo nekoliko narodnih naziva, a najpoznatiji su velevjetni kukurijek i kukurijek (5). Osim toga, budući da biljka obično cvate od veljače do travnja, a ponekad kad je zima blaga može procvasti već u siječnju ili prosincu, zovu je snježnica ili božićnjak (7).

## BOTANIČKI PODACI

### 1. Morfološka obilježja porodice Ranunculaceae – žabnjaci

Porodica *Ranunculaceae* sastoji se od brojnih rodova i vrsta raznovrsne građe i izgleda. Biljke iz te porodice mogu biti jednogodišnjice, no uglavnom su zeljaste trajnice. Vrlo rijetko su razvijene kao drvenasti grmovi ili penjačice (*Clematis* L.).

Listovi su pršljenasto, izmjenično ili rijetko nasuprotno raspoređeni, uglavnom bez palistića, s razvijenim rukavcem i peteljkom različite dužine; jednostavni su ili trodjelno odnosno perasto sastavljeni, a njihove plojke mogu biti cjelovite, rascijepljene, razdijeljene ili izrezane, na rubu cijele ili različito urezane.

Cvjetovi su obično dvospolni, pravilne ili nepravilne građe, s produženom ili skraćenom cvjetnom osi na kojoj se redaju dijelovi cvijeta spiralno ili u krugovima te su redovito lijepo obojeni. Ocvijeće je jednostruko ili dvostruko, aktinomorfno ili zigomorfno, a često je sastavljeno od 4, 5 ili više listića. Listići ocvijeća smješteni su na cvjetištu izmjenično, u pršljenovima, ali najčešće spiralno, a oni su svi, ili samo unutarnji, živo obojeni, to jest vjenčiću slični (korolinični), ili su razlučeni u čašku i vjenčić. Nektariji nastali metamorfom prašnika korolinični su poput latica. U cvijetu ima mnogo prašnika kojima se prašnice otvaraju uzdužnim pukotinama.

Plodnice su nadržale i slobodne, njihov broj je različit; najčešće ih u cvijetu ima mnogo, a vrlo rijetko samo jedna. Svaka plodnica sadrži jedan ili više sjemenih zametaka. Plod je najčešće mjehur s puno sjemenki, a rjeđe jednosjemeni oraščić, tobolac ili boba (2, 7–10).

### 2. Anatomska obilježja porodice Ranunculaceae – žabnjaci

Listovi vrsta porodice *Ranunculaceae* imaju sloj skoro isključivo jednostaničnih pokrovnih dlaka. Osim toga, u mnogih vrsta pojavljuju se jednostanične dlake tankih stijenki, kao i kijačaste i bučaste dlake nalik žljezdastim



Slika 1. *Helleborus niger* L. subsp. *macranthus* (Freyn) Schiffner –  
**VELECVJETNI KUKURIJEK**

dlakama. Prave žljezdane dlake s jednostaničnim glavicama pojavljuju se tijekom cvatnje u roda *Aconitum* L.

Unutrašnji ekskrecijski organi nisu poznati. Inače vrste te porodice ne sadrže kalcij-oksalat, ali su u nekih rodova zamijećeni mali kristali. Podanci i lukovice sadrže dosta škroba, a u rodova *Adonis* L., *Helleborus* L. i *Eranthis* Salisb. mnogo masnog ulja (11).

### 3. Morfološka obilježja crnog i velevjetnog kukurijeka

Crni kukurijek (*H. niger*) trajnica je kvrgava, crnosmedeg podanka i vlaknasta korijenja (6). Stabljika je uspravna, 10–30 cm visoka (2,12).

Prizemni su listovi kožasti i zimzeleni, na dugim valjkastim peteljka koje nemaju uzdužnu brazdu; plojka se sastoji od 5-10 lisaka, srednje su većinom cjelovite, široko lancetaste ili gotovo klinaste, u gornjoj trećini grubo ili usiječeno pilaste, dok su postrane liske stopalasto sastavljene ili izrezane na nekoliko grubo pilastih isperaka (13).

Biljka ima 1–3 cvijeta promjera 5–11 cm (2). Cvjetovi su ovalni i u početku bijeli, a starenjem postaju grimizno crveni. Jednostavni perijant sastavljen je od 5 duguljastih do široko jajastih listića. Nektarija ima do 12, oni su cjevasto-ljevjkasta oblika, žutozeleni (6,10).

Plodovi su duguljasti mjehuri s kratkim šiljkom na vrhu i s više sjemenaka koje su duguljasto valjkaste, crne, na površini mrežasto naborane, s bijelim spužvastim privjeskom (14).

Crni kukurijek ima dvije podvrste:

a) *H. niger* L. subsp. *niger*; on ima sjajne tamnozeleno listove čiji su dijelovi rombično klinasti, a njihovi su zupci prilegli. Cvjetovi su 5–8 cm u promjeru, lapovi su bijeli ili slabo crvenkasti,  $2n=32$  (2,3).

b) *H. niger* L. subsp. *macranthus* (Freyn) Schiffner; listovi su plavičasto-zeleni, a segmenti široko lancetasti s više ili manje stršećim zupcima. Listovi podvrste *macranthus* veći su od listova podvrste *niger*. Cvjetovi su 8–11 cm u promjeru, a lapovi su većinom bijeli ili blago crvenkasto nahukani,  $2n=32$  (3,5,9) (slika 1.).

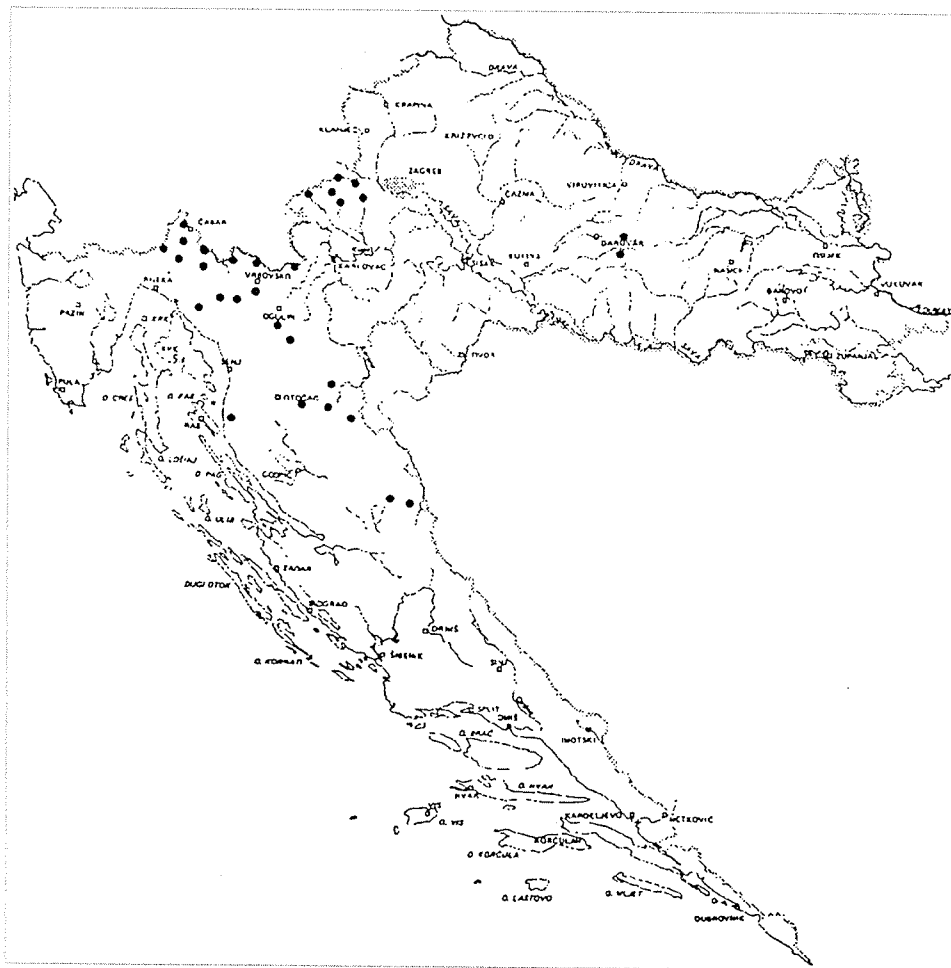
Biljka se razmnožava sjemenkama, a fakultativno i vegetativno dijeljenjem podanka. U kulturi dobro uspijeva, ali je često ugrožena virozama (4).

#### 4. Geografska rasprostranjenost velevčjetnog kukurijeka i njegova prirodna staništa

Velevčjetni kukurijek pripada ilirskom flornom elementu. Većim dijelom rasprostranjen je u brdsko-planinskom području goransko-ličke regije: u Gorskom kotaru na risnjačkom skupu planina, Maloj i Velikoj Kapeli i Ličkoj Plješivici te na sjevernom Velebitu. Manji izdvojeni dio areala nalazi se na Samoborskom gorju i Žumberku. Biljka raste i istočno od Sutle, tako da je nađena i kod Krapine i Sutinskih toplica. Najistočnije izolirano nalazište je na području Papuka (4) (Slika 2.). Ova biljka može se naći i u južnom Tirolu (3), Sloveniji (25) te u još nekim predjelima sjeverne Italije (2,15).

Velevčjetni kukurijek raste na dolomitnoj podlozi, za koju je u mnogim slučajevima i lokalni fitoindikator. Raste na neutralnim ili slabo bazičnim, propusnim i suhim tlima kao što su rendzine i neka smeđa tla. Biljku najčešće nalazimo u brdskim područjima gdje je karakteristična svojta bukovih šuma (*Fagetum montanum*) i bukovo-jelovih šuma (*Abieti-Fagetum*). Na području Male Kapele i Plješivice karakterizira posebne tipove bukovih, borovih i smrekovih šuma na dolomitu (*Helleboro-Fagetum*, *Helleboro-Pinetum* i *Piceetum dolomiticum*). Može se naći i u šumama hrasta medunca i crnog graba, na livadama kalničke šašike, među grmljem i na još nekim staništima (4,6). Velevčjetni kukurijek je najbrojniji na rubovima navedenih šuma gdje raste u većim ili manjim skupinama, a u gustim šumama najčešće pojedinačno.

Cvjetovi i listovi često se sabiru u dekorativne svrhe. Sabiranje, sječa šuma i zahvati koji mijenjaju uvjete staništa te kisele kiše smanjuju broj primjeraka te zaštićene vrste (4).



Slika 2. Nalazište vrste *Helleborus niger* L. subsp. *macranthus* (Freyn) Schiffner

## KEMIJSKI PODACI

### 1. Kemijski sastav porodice Ranunculaceae

Prema Hegnaueru (11), u vrstama porodice *Ranunculaceae* zastupljeni su sljedeći spojevi: flavonoidi, alkaloidi, cijanogenični spojevi, saponini, kardenolidi i bufadienolidi, organske kiseline, rezervne tvari vegetativnih organa i sjemenaka te mineralne tvari.

### Flavonoidi

Od flavonoida najviše su istraživani flavonoli, flavoni i glukoflavoni.

Kromatografskim i spektrometrijskim metodama dokazani su kvercetin- i kemferol-heterozidi u laticama i prašnicama vrsta *Caltha palustris* L., *Helleborus niger* L. i *Pulsatilla alpina* (L.) Delarbre ssp. *alpina*, i u laticama vrste *Helleborus foetidus* L.

U listovima vrste *Thalictrum foetidum* L. identificirani su rutin i ramnetin-3-glukozid, dok su kvercetin i izoramnetin dokazani u listovima vrste *Delphinium zalil* Aitch. et Hemsl.

Kemferitrin (=Lespedin) i kemferol-7-ramnozid izolirani su iz listova vrste *Aconitum orientale* Mill., dok su kemferol i kvercetin izolirani iz zeljastih dijelova vrste *Nigella arvensis* L. (11).

Iz listova vrste *Clematis maximowicziana* Franch. et Sav. izoliran je flavon terniflorin. Iz listova vrste *Thalictrum thunbergii* DC. izoliran je apigenin-7-galaktozid (=taliktrin). U rodova *Adonis* L. i *Trollius* L. čini se da su flavonol-heterozidi nadomješteni glukoflavonima, jer *Adonis vernalis* L. za vrijeme cvatnje sadrži orientin, izoorientin i izoorientinmonoksilozid. Također i cvjetovi vrste *Trollius europaeus* L. sadrže orientin. Osim u tim rodovima, glukoflavoni se nalaze i u rodovima *Ranunculus* L. i *Thalictrum* L. (11).

#### Ostali značajniji spojevi

U kemijskom sastavu postoji velika sličnost pojedinih rodova te porodice. *Paenoiodeae* se odlikuju biljnim dijelovima u kojima se često nalaze smole, trjeslovine i razni alkaloidi, kao npr. hidrastin, hidrastinin, kanadin, peonin i berberin. Vrste roda *Thalictrum* L. sadrže također neke alkaloidne, a vrste rodova *Anemone* L., *Ranunculus* L. i drugih pak sadrže oštre i s vodenim parama hlapljive tvari, kao što je npr. anemonol.

Vrste roda *Helleborus* L. s nepravilnim cvjetovima sadrže alkaloidne kao što su akonitin, nepalin i delfinin. U predstavnika skupine s pravilnim cvjetovima nalazimo također heterozid heleborein i saponin heleborin. Gotovo su sve biljke te porodice zbog tih spojeva ljute i otrovne. Mnoge vrste te porodice sadrže i otrovnu tvar protoanemonin, koja štetno djeluje na sve vrste domaćih životinja osim na svinje (7,10).

Droga *Hellebori radix (rhizoma)* koja se dobiva iz vrsta *Helleborus niger* L., *Helleborus viridis* L. i *Helleborus odorus* Waldst. et Kit. sadrži kardiotoične heterozide koji pripadaju tipu bufadienolida. Glavni heterozid u vrstama *H. viridis* L. i *H. odorus* Waldst. et Kit. je helebrin (0,4–0,5%) (16).

#### 2. Kemijski sastav crnog i velevcjjetnog kukurijeka

*H. niger* L. u svom kratkom crnkastom podanku (*Rhizoma hellebori nigri*) sadrži saponinski heterozid heleborin, heterozid heleborein, heterozid helebrin (po djelovanju sličan strofantinu) te aglikon helebrigenin. Svi dosad navedeni spojevi imaju ljut i gorak okus, a pronađeni su i u drugih vrsta kukurijeka. Oni su ujedno i toksične tvari pa se mora paziti na dozu pri uporabi pripravaka koji ih sadrže (13,14,17,18).

Osim navedenih spojeva, *H. niger* L. sadrži i akonitinsku kiselinu, masno ulje, škrob, kalcij-fosfat, eterično ulje, različite steroide te alkaloidne (13–18).

U cvjetovima vrste *H. niger* L. identificirani su i neki flavonoidi kao npr. kvercetin- i kemferol-heterozidi (15).

Glede kemijskog sastava podvrste *H. niger* L. subsp. *macranthus* (Freyn) Schiffner poznato je da korijen i podanak sadrže steroidne saponine (npr. makrantogenin odnosno makrantozid I) te da posjeduju helebrin u tragovima (11,15).

## DJELOVANJE I UPORABA KUKURIJEKA

Kukurijeci su biljke vrlo oštrog okusa, pale sluznicu i pripadaju skupini narkotičnih i otrovnih biljaka. Ta su im svojstva odavno poznata. Zato ih je narod od davnina upotrebljavao za liječenje raznih bolesti. Tako su se u narodnoj medicini upotrebljavali različiti kukurijeci, bez obzira kojoj vrsti pripadali, jer se u svih tih biljaka djelovanje temelji na nazočnosti helebrina i heleboreina, koji se nalaze u podancima ili korijenju te u prizemnim listovima (10). Utvrđeno je da je opasno uživati svježe dijelove ovih biljaka, jer to može izazvati nesvjesticu, povraćanje, proljev, grčeve, ukočenost pa i smrt ljudi i životinja.

Puk je često rabio kukurijek za liječenje domaćih životinja.

Podanak zelenog kukurijeka (*Rhizoma hellebori viridis*) primjenjivao se kao purgativ, drastik, lijek za srce, opojno sredstvo i lijek za živce.

U Grčkoj i Maloj Aziji raste *H. orientalis* Lam. čiji se podanak nekada rabio kao lijek protiv vodene bolesti, padavice, melankolije, povratne groznice, kao lijek za povraćanje itd. (10).

Od crnog kukurijeka (*H. niger* L.) kao droga rabe se podanak – *Rhizoma hellebori nigri* – i korijen – *Radix hellebori nigri* (16,18). Kao što je i prije navedeno glavne djelatne sastavnice su helebrin, heleborein i heleborin. Helebrin je kardiotonični heterozid s jakim djelovanjem na srce, slično djelovanju heterozida strofantusa, a osim toga djeluje i diuretski. U liječenju je bolje primjenjivati čistu supstanciju helebrin nego drogu, jer ona izaziva mučnine i povraćanje zbog drugih spojeva (16). Heleborein je također zanimljiv spoj jer je njegovo fiziološko djelovanje na stanice slično kao djelovanje digitalisa pa bi se također mogao primjenjivati u liječenju srca (17). Pokušaji da se droga primjeni kao sredstvo u liječenju srca nisu uspjeli zbog slabe resorpcije heleboreina te nezanemarlivog upalnog i nadražajnog djelovanja. Saponinski heterozid heleborin djeluje na sluzokožu izrazito nadražujuće (povraćanje, laksativno djelovanje), a na središnji živčani sustav blokirajuće (13). Ova droga se od davnina rabila u pučkoj medicini kao laksativ i sredstvo za povraćanje (18) te u obliku praška kao sredstvo za liječenje duševnih poremećaja (10,17). Primjenjuje se i u homeopatiji kod bubrežnih i mokraćnih tegoba (16). Glavna je uporaba droge u liječenju srca te kao diuretik (16). Osim toga rabi se i kao prašak pri hunjavici, menstrualnim tegobama, mokraćnom kamencu, žutici, pri problemima sa živcima, protiv vodene bolesti, kožnih tegoba, gnojnih čireva i glista (13,18). Izvana se droga primjenjuje u liječenju šuge u životinja (14,17). U veterinarstvu se primjenjuje i kao laksans, a rabi se i za uništavanje biljnih nametnika (18).



## EKSPERIMENTALNI DIO

### *Biljni materijal*

Kao materijal za ispitivanje uporebljeni su listovi i cvjetovi velevjetnog kukurijeka, *Helleborus niger* L. subsp. *macranthus* Freyn (Schiffner), skupljeni 21. veljače 1997. godine na Samoborskom gorju.

#### 1. Identifikacija biljnog materijala

Identitet ispitivane biljne vrste potvrđen je ispitivanjem vanjske i unutarnje građe skupljenog uzorka. Ispitivanje je provedeno prema literaturnim podacima (2,3,8) i farmakopejskim propisima za »Ispitivanje droga«.

#### 2. Ispitivanje nazočnosti flavonoida tankoslojnom kromatografijom

Ispitivanju su podvrgnuti metanolni ekstrakti listova i cvjetova velevjetnog kukurijeka uz poredbene supstancije-flavonoide: izokvercitrin (Iz) i rutin (R). Od poredbenih supstancija pripremljene su 0,05%-tne metanolne otopine.

Ekstrakti listova i cvjetova pripremljeni su tako da je 1 g praškasto usitnjenih listova i cvjetova ekstrahirano sa 10 ml metanola 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo na 60 °C. Bistri filtrat nakon hlađenja, služio je kao otopina za kromatografsko ispitivanje (19).

Pri ispitivanju nazočnosti kemferola (Ke) i kvercetina (Kv) u listovima i cvjetovima velevjetnog kukurijeka uporebljen je etilacetatni ekstrakt dobiven u postupku hidrolize pri spektrofotometrijskom određivanju ukupnog sadržaja flavonoida prema Christu i Mülleru (20). I u tom slučaju primijenjene su 0,05%-tne metanolne otopine poredbenih supstancija kemferola i kvercetina.

Ispitivanje nazočnosti flavonoida provedeno je na tankom sloju Kieselgel 60 F<sub>254</sub> u tri smjese otapala: etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27 V/V/V/V) (19), etilacetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1 V/V/V) (21) i toluen – etilformijat – mravlja kiselina (5:4:1 V/V/V) (22).

Detekcija odijeljenih flavonoida provedena je promatranjem pod UV zračenjem kod 365 nm nakon prskanja kromatograma modificiranim Naturstoff reagensom (NST/PEG). Reagens je pripremljen miješanjem 1%-tne metanolne otopine β-etilaminoestera difenilboratne kiseline (NST) i 5%-tne etanolne otopine polietilenglikola 4000 (PEG). Modificirani Naturstoff reagens specifičan je reagens za detekciju flavonoida. Obojenja nastaju odmah, a uvjetovana su strukturom flavonoidnih spojeva. Narančaste fluorescencije karakteristične su za derivate kvercetina i miricetina (flavonoli) te luteolina (flavon), a žutozelene za derivate kemferola i izoramnetina (flavonoli) te apigenina (flavon). Dodatkom PEG-a povisuje se granica detekcije (19).

### 3. Određivanje količine flavonoida spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru

Sadržaj flavonoida u uzorcima listova i cvjetova određen je metodom prema Christu i Mülleru (20), koja se temelji na hidrolizi flavonoidnih heterozida i određivanju ukupnih aglikona nakon stvaranja kompleksa s  $Al^{3+}$  u smjesi metanola, etilacetata i octene kiseline.

### 4. Dokazivanje trjeslovina na temelju stvaranja obojenih produkata i taloga

Dokazivanje trjeslovina provodi se tako da se najprije odvaže 1 g listova (cvjetova) u prašku, zatim se doda 50 ml destilirane vode i zagrijava na vodenoj pari uz povratno hladilo 15 minuta. Dobivena iscrpina se nakon hlađenja filtrira a dobiveni filtrat uporabi se za reakcije (21,23).

Opće reakcije za dokazivanje trjeslovina provedene su u četiri epruvete: u tri epruvete (a,b,d) ulije se 2 ml filtrata, a u četvrtu (c) 5 ml filtrata. U epruvetu a) dodane su 2 kapi otopine željezo (III)-klorida, u epruvetu b) 2–3 kapi otopine željezo (III)-amonij-sulfata, u epruvetu c) 0,5 ml otopine olovo-subacetata, a u epruvetu d) 2 ml otopine želatine (21).

Reakcija na flobatanine provedena je sa formaldehidom i kloridnom kiselinom, a reakcija na pirogalolske trjeslovine s natrij-acetatom i željezo (III)-amonij-sulfatom (21).

Za dokazivanje katehinskih trjeslovina 0,2 g pulveriziranog biljnog materijala pomiješano je s 10 ml metanola, zagrijavao do vrenja i filtrirano. Zatim je 1 ml filtrata pomiješano s 0,5 ml otopine vanilina (1g:100 ml 96% etanola) i 1 ml koncentrirane kloridne kiseline (21).

### 5. Određivanje količine ukupnih polifenola i trjeslovina

Za određivanje sadržaja ukupnih polifenola i trjeslovina primijenjena je spektrofotometrijska metoda prema Schneideru (24), koja se temelji na taloženju trjeslovina s kazeinom.

## REZULTATI I RASPRAVA

### 1. Morfološka identifikacija listova

Ova identifikacija napravljena je prema literaturnim podacima (2,3,5,8), odnosno na temelju morfoloških obilježja listova.

Listovi velevjetnog kukurijeka su bez sjaja, plavičasto zeleni. Segmenti listova su široko lancetasti, sprijeda sa stršećim, više-manje bodljastim zubcima. Peteljke su valjkasta oblika bez žljebasta udubljenja. Rukavac peteljke ima na ventralnoj strani dosta velike, nitaste i savijene ili stršeće uškaste nastavke kojima obuhvaća pup ili bazalni dio mladog lista. Površina peteljke je prilično hrapava i crvenkasto pjegava. Plojka je stopalasto razdijeljena na 5–8 primarnih segmenata, dok sa sekundarnim ispercima ima prosječno 7–10 isperaka (5).

## 2. Anatomska identifikacija listova

List velevjetnog kukurijeka pokazuje dorziventralnu građu. S gornje i donje strane lista nalazi se dosta debela i naborana kutikula. Epidermalne stanice i s gornje i s donje strane lista nalikuju na pravokutnike zadebljalih rubova, koji su malo izbočeni prema van u središnjem dijelu. Puči se nalaze samo na donjoj epidermi. Mezofil lista diferenciran je na palisadni i spužvasti parenhim. Palisadni parenhim je jednoslojan, stanice su izdužene i zbijene jedna do druge, a s obzirom na stanice gornje epiderme, na jednu epidermalnu stanicu dolaze dvije stanice palisadnog parenhima. Spužvasti parenhim sastoji se od šest slojeva stanica različitih oblika (okruglaste ili izdužene stanice). Pri ovom ispitivanju lista nije utvrđeno postojanje kalcij-oksalata, sluzi ili drugih tvari koje bi mogle biti sastavni dio lista.

U prašku lista te biljke nalaze se: brojne puči, epidermalne stanice, spiralne i mrežaste traheje te dijelovi mezofila s provodnim elementima.

## 3. Dokazivanje flavonoida

Metanolni i etilacetatni ekstrakti listova i cvjetova velevjetnog kukurijeka ispitani su na nazočnost flavonoida tankoslojnom kromatografijom. Za odvajanje flavonoida i fenolnih kiselina uporabljene su tri smjese otapala (19,21,22). Nakon prskanja kromatograma modificiranim Naturstoff reagensom (NST/PEG) i promatranjem pod UV zračenjem kod 365 nm, uočene su narančaste, žutozelenene, plave, zelenkaste i plavozelene fluorescencije.

Odjeljivanjem mobilnom fazom etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:27 V/V/V/V) u ekstraktu listova velevjetnog kukurijeka uočava se 12 mrlja, a u ekstraktu cvjetova 14 mrlja (*Skica 1.*). Od šest mrlja žutonarančaste fluorescencije – 2, 3, 5, 6, 9 i 11, mrlja 11 ( $R_F=0,70$ ) odgovarala bi poredbenoj supstanciji izokvercitrinu. Ostalih pet mrlja s obzirom na narančaste fluorescencije i na  $R_F$  vrijednosti mogle bi pripadati flavonoidnim heterozidima-derivatima kvercetina. Najjaču fluorescenciju imaju mrlje 2, 6 i 11. Ekstrakti listova i cvjetova velevjetnog kukurijeka također sadrže i mrlje plave, plavozelene, zelene i plavoljubičaste fluorescencije – mrlje 8, 10, 12, 13 i 14. Ove bi mrlje s obzirom na boje svoje fluorescencije, koje su karakteristične za fenolne kiseline, mogle predstavljati neke fenolne kiseline. Mrlja 1 ( $R_F=0,08$ ) ima zelenu fluorescenciju karakterističnu za derivate kemferola, pa bi to mogao biti flavonoidni heterozid derivat kemferola. Mrlja 4 ( $R_F=0,28$ ) plave fluorescencije i mrlja 7 ( $R_F=0,46$ ) žute fluorescencije uočene su samo u ekstraktu cvjetova.

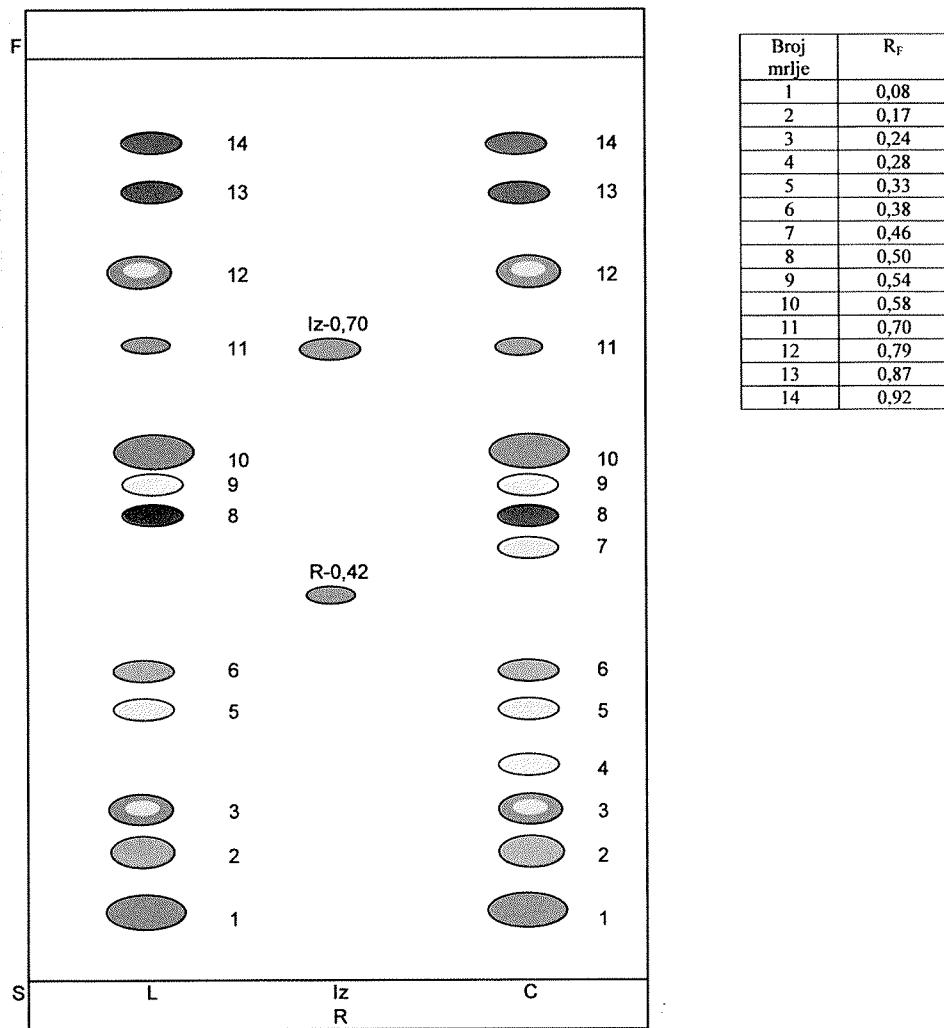
Slična kromatografska slika (*Skica 2.*) dobivena je odjeljivanjem flavonoida i fenolnih kiselina smjesom otapala etilacetat – mravlja kiselina – voda (8:1:1 V/V/V). Jedina je razlika u odnosu na *Skicu 1.* nešto niže  $R_F$  vrijednosti flavonoida i fenolnih kiselina.

Odjeljivanje etilacetatnih ekstrakata listova i cvjetova dobivenih hidrolizom provedeno je uz uporabu mobilne faze toluen – etilformijat – mravlja kiselina (5:4:1 V/V/V). Pritom je dobiveno pet mrlja (*Skica 3.*). Dvije mrlje – 1 i 4 bile su narančaste fluorescencije. Mrlja 4 ( $R_F=0,47$ ) odgovarala bi prema

## Skica 1.

Stacionarna faza: Kieselgel 60 F<sub>254</sub> »Merck«Razvijač: etilacetat : mravlja kiselina : ledena octena kiselina : voda  
(100:11:11:27 V/V/V/V)

Detekcija: NST/PEG (UV-365 nm)



L=20  $\mu$ L (metanolni ekstrakt listova), Iz=5  $\mu$ L, R=2  $\mu$ L,  
C=20  $\mu$ L (metanolni ekstrakt cvjetova)

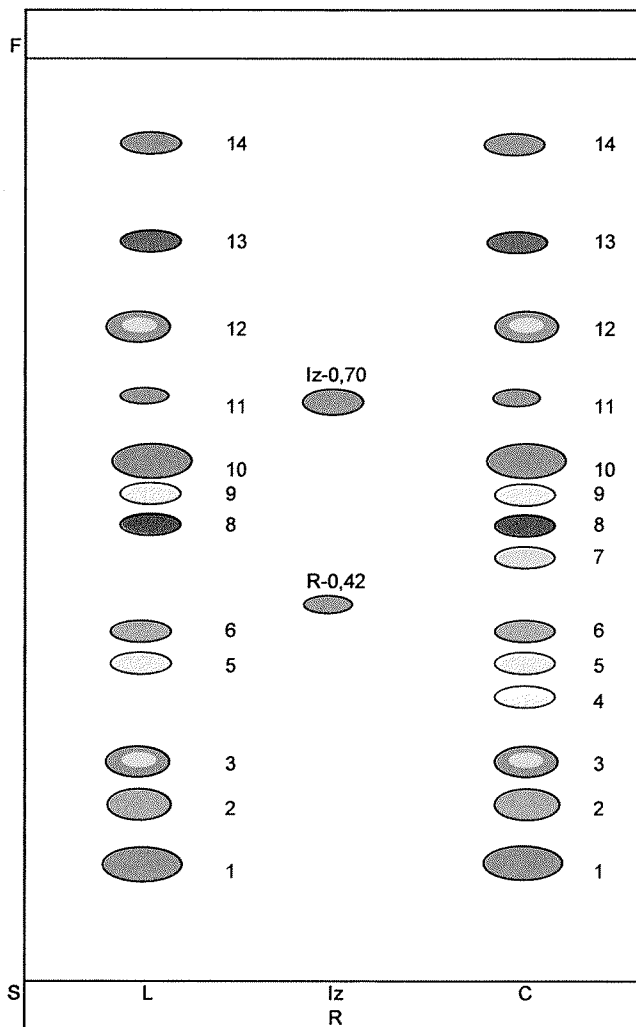
boji i R<sub>F</sub> vrijednosti poredbenoj supstanciji kvercetin. Na kromatogramu su prisutne i dvije mrlje (2 i 5) zelenkastožute fluorescencije. Mrlja 5 (R<sub>F</sub>=0,54) s obzirom na boju i R<sub>F</sub> vrijednost odgovara poredbenoj supstanciji kemferolu.

Skica 2.

Stacionarna faza: Kieselgel 60 F<sub>254</sub> »Merck«

Razvijač: etilacetat : mravlja kiselina : ledena octena kiselina : voda  
(8:1:1 V/V/V)

Detekcija: NST/PEG (UV-365 nm)



Broj mrlje	R <sub>F</sub>
1	0,05
2	0,13
3	0,16
4	0,20
5	0,23
6	0,25
7	0,28
8	0,38
9	0,43
10	0,48
11	0,57
12	0,68
13	0,76
14	0,94

L=20 μL (metanolni ekstrakt listova), Iz=5 μL, R=2 μL,  
C=20 μL (metanolni ekstrakt cvjetova)

Mrlja 3 (R<sub>F</sub>=0,39) plave je fluorescencije pa bi s obzirom na to da je plava boja karakteristična za fenolne kiseline, ona mogla predstavljati jednu od njih.

Skica 3.

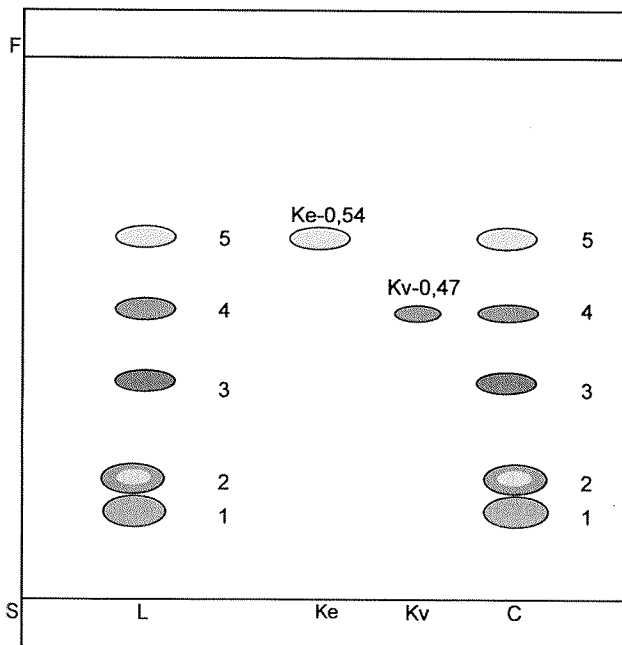
Stacionarna faza: Kieselgel 60 F<sub>254</sub>

Razvijajući: toluen : etilformijat : mravlja kiselina

(5:4:1 V/V/V)

Detekcija: NST/PEG (UV-365 nm)

R <sub>F</sub>
0,05
0,13
0,16
0,20
0,23
0,25
0,28
0,38
0,43
0,48
0,57
0,68
0,76
0,94



Broj mrlje	R <sub>F</sub>
1	0,07
2	0,12
3	0,39
4	0,47
5	0,54

L=60 μL (etilacetatni ekstrakt listova), Ke=3 μL, Kv=3 μL,  
C=60 μL (etilacetatni ekstrakt cvjetova)

Na temelju ovih kromatograma dokazano je da su u listovima i cvjetovima velevjetnog kukurijeka nazočni izokvercitrin, te drugi derivati kvercetina i derivati kemferola.

#### 4. Kvantitativna analiza flavonoida

Kvantitativna analiza flavonoida provedena je metodom prema Christu i Mülleru. Količina flavonoida određena je u uzorcima četiri puta, a iz dobivenih rezultata izračunate su srednja vrijednost i standardna devijacija. Listovi su sadržavali  $0,43 \pm 0,01\%$ , a cvjetovi  $0,69 \pm 0,06\%$  flavonoida.

#### 5. Kvalitativna analiza trjeslovina

Kvalitativne reakcije na trjeslovine potvrdile su nazočnost tih tvari u listovima i cvjetovima velevjetnog kukurijeka.

Dodatkom otopina željeznih soli došlo je do stvaranja tamnozelenog zamućenja u ekstraktima i lista i cvijeta, ali je kod ekstrakata cvijeta to zamućenje bilo tamnije i izraženije.

Reakcija s olovo-subacetatom rezultirala je zelenkastim zamućenjem.

Ekstrakti listova i cvjetova dali su s otopinom želatine zamućenja.

Reakcija s formaldehidom i kloridnom kiselinom pomoću koje bi se moglo odvojiti, tj. istaložiti katehinske trjeslovine dala je negativne rezultate. U filtratu je ispitivana nazočnost pirogalolskih trjeslovina s otopinom natrij acetata i željezo (III)-amonij-sulfata pri čemu je nastao ljubičastoplavi precipitat.

Ispitivanje nazočnosti katehinskih trjeslovina provjereno je i pomoću reakcije s vanilinom i koncentriranom kloridnom kiselinom, no i ta reakcija je dala negativne rezultate.

### 6. Kvantitativna analiza trjeslovina

Za određivanje sadržaja ukupnih polifenola i trjeslovina u listovima cvjetovima velecvjetnog kukurijeka primijenjena je spektrofotometrijska metoda prema Schneideru. Sadržaj ukupnih polifenola i trjeslovina određen je u uzorcima četiri puta i izražen masenim udjelom (%) (g ukupnih polifenola odnosno trjeslovina u 100 g droge). Kod dobivenih rezultata izračunate su srednja vrijednost i standardna devijacija. Listovi su sadržavali  $4,38 \pm 0,06\%$  a cvjetovi  $5,40 \pm 0,08\%$  ukupnih polifenola. I količina trjeslovina bila je veća u uzorcima cvjetova ( $0,54 \pm 0,02\%$ ) u odnosu na listove ( $0,38 \pm 0,06\%$ ).

## ZAKLJUČAK

U metanolnim ekstraktima listova i cvjetova velecvjetnog kukurijeka *Helleborus niger* L. subsp. *macranthus* (Freyn) Schiffner utvrđena je metodom tankoslojne kromatografije nazočnost flavonoida i fenolnih kiselina. Usporedbom s poredbenom supstancijom dokazano je da ekstrakti sadrže flavonolski heterozid izokvercitrin. Nakon provedene kiselne hidrolize, u ekstraktima listova i cvjetova identificirani su flavonolski aglikoni kvercetin i kemferol.

Kvantitativna analiza je pokazala da cvjetovi sadrže 0,69%, a listovi 0,43% flavonoida.

U vodenim ekstraktima listova i cvjetova utvrđena je nazočnost pirogalolskih trjeslovina reakcijama stvaranja taloga i reakcijama stvaranja obojenih produkata.

Rezultati kvantitativne analize pokazali su da je sadržaj ukupnih polifenola u cvjetovima 5,40%, a u listovima 4,38%, dok je količina trjeslovina u cvjetovima 0,54%, a u listovima 0,38%.

## Literatura – References

1. G. *Hegi*, Illustrierte Flora von Mittel Europa, Band III/I, A. Pichler's Witwe Sohn, Wien 1911, 463, 466.
2. T. G. *Tutin*, N. A. *Burges*, A. O. *Chater*, J. R. *Edmondson*, V. H. *Heywood*, D. M. *Moore*, D. H. *Valentine*, S. M. *Walters*, D. A. *Webb Eds.*, Flora Europaea, Volume 1, Cambridge University Press, Cambridge 1993, 248, 249, 251.
3. Z. *Martinis*, rod *Helleborus*. In: Analitička Flora Jugoslavije, I, 2:234 (red. S. Horvatić, I. Trinajstić), Institut za botaniku Sveučilišta Zagreb, Zagreb 1973.
4. Č. *Šilić*, Šumske zeljaste biljke, Svjetlost, Sarajevo 1988, 38.
5. Crvena knjiga biljnih vrsta Republike Hrvatske (uredio Ivan *Šugar*), Ministarstvo graditeljstva i zaštite okoliša, Zavod za zaštitu prirode, Zagreb 1994, 241.
6. Z. *Martinis*, Komparativno-anatomska istraživanja prizemnih listova nekih vrsta roda *Helleborus*, Magistarski rad, Zagreb 1968, 52.
7. S. *Forenbacher*, Žumberak-kalendar flore Žumberačke gore, Školska knjiga, Zagreb 1995, 116.
8. K. *Dubravec*, Botanika, Sveučilišna naklada d.o.o., Zagreb 1991, 383.
9. S. *Horvatić*, Ilustrirani bilinar, Školska knjiga, Zagreb 1954, 214.
10. F. *Kušan*, Ljekovito i drugo korisno bilje, Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb 1956, 205, 208.
11. R. *Hegnauer*, Chemotaxonomie der Pflanzen, Band 6, Birkhäuser Verlag, Basel 1973, 12, 28.
12. O. *Polunin*, Pflanzen Europas, BLV Verlagsgesellschaft, München 1977, 40.
13. R. *Wasicky*, Physiopharmakognosie II, Verlagsbuchhandlung Carl Fromme GmbH, Wien 1932, 508.
14. E. *Perrot*, R. *Paris*, Les plantes médicinales, Presses universitaires de France, 1971, 116.
15. S. *Liedtke*, E. *Lorch*, P. *Goedings*, M. *Wichl*, Pharmazie **52** (1997) 12.
16. H. *Wagner*, Pharmazeutische Biologie-Drogen und ihre Inhaltsstoffe, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1988, 142.
17. E. *Perrot*, Matières premières usuelles du règne végétal, Masson et CIE, Paris 1943–1944, 821.
18. H. A. *Hoppe*, Drogenkunde, Band I, Angiospermen, 8. Auflage, Walter de Gruyeter, Berlin 1975, 572.
19. H. *Wagner*, S. *Bladt*, E. M. *Zgainski*, Drogenanalyse, Springer Verlag, Berlin 1983, 163.
20. B. *Christ*, K. H. *Müller*, Arch. Pharm. **293** (1960) 1033.
21. M. *Luckner*, Prüfung von Drogen, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1966, 225.
22. E. *Stahl*, Dünnschicht Chromatographie, Springer Verlag, Berlin 1967, 655.
23. R. *Fischer*, Th. *Kartnig*, Drogenanalyse, Springer Verlag, Wien 1978, 423.
24. G. *Schneider*, Arch. Pharm. **309** (1976) 38.
25. F. *Šuštar*, Rastlinski svet Šmarne gore z grmado. Flora, mikoflora in vegetacija: Biološki inštitut Jovana Hadžija ZRC SAZU, Ljubljana 1998.

Primljeno 13. IV. 1999.