

Anatomska i fitokemijska karakterizacija vrsta *Satureja montana* L. subsp. *montana* i *Satureja subspicata* Bartl. ex Vis. subsp. *liburnica*

Stanić, Gordana; Blažeković, Biljana; Vladimir-Knežević, Sanda

Source / Izvornik: *Farmaceutski glasnik*, 2004, 60, 593 - 602

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:550403>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

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



**Anatomska i fitokemijska karakterizacija vrsta
Satureja montana L. subsp. *montana* i
Satureja subspicata Bartl. ex Vis. subsp. *liburnica***

GORDANA STANIĆ, BILJANA BLAŽEKOVIĆ, SANDA VLADIMIR KNEŽEVIĆ

Zavod za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Anatomical and phytochemical characterization of *Satureja montana* L. subsp. *montana* i *Satureja subspicata* Bartl. ex Vis. subsp. *liburnica*

S u m m a r y – Specimens of *Satureja montana* subsp. *montana* and *Satureja subspicata* subsp. *liburnica* from mountain Velebit were comparatively analyzed regarding their anatomy and chromatographic features. Microscopical observation of their leaf section revealed the presence of papillose, unicellular and bicellular covering trichomes with warty walls as well as two types of glandular trichomes that are characteristic for Lamiaceae family. Differences of studied *Satureja* species are based on the structure of glandular trichomes, pubescence density and the frequency of each trichome type as well. In contrast to *S. subspicata* that has glabrous stem, the stem of *S. montana* is covered with numerous unicellular and multicellular trichomes. Chemical analysis of leaf extracts performed by thin layer chromatography showed the presence of flavonoids, caffeic acid, rosmarinic acid, ursolic acid and monoterpene phenols (thymol and/or carvacrol). It has been found that different chromatographic features of flavonoid composition enable reliable characterization each of *Satureja* species studied.

(Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb, Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Croatia)

UVOD

Vrste *Satureja montana* L. (primorski, krški, bijeli vrisak) i *Satureja subspicata* Bartl. ex Vis. (modri ili klasoliki vrisak) koje pripadaju porodici *Lamiaceae*, mediteranske su biljke i karakteristične sastavnice kraške flore.

Vrsta *S. montana* raste među kamenjem i pukotinama stijena od obale pa sve do 1400 m nadmorske visine (1). Biljka je polugrm (10–40 cm), uspravnih ili povijenih grančica koje odrvenjuju, vitke su, tupo četverobridne do gotovo okrugle i obrasle finim dlakama (1, 2). Listovi su linearno kopljasti, bez izrazite peteljke, dugi 1–2 cm, široki 2–3 mm, debeli, pomalo kožasti i sjajni, ušiljenog vrha, obrasli žljezdastim dlakama. Cvjetovi su na stapkama, dugi oko 1 cm. Po 3 do 7 cvjetova združeno je u rahli metličasti cvat. Vjenčić je bijele, rjeđe crvenkaste boje, cijev je vjenčića duža od čaške, a gornja usna okruglasta i plosnata. Donja je usna nešto duža, s tri režnja, od kojih je srednji malo nazubljen i s ljubičastim točkama. Cvate od kolovoza do listopada.



Satureja montana L.

Vrsta *S. subspicata* raste na sličnim mjestima kao i prethodna vrsta, većinom združena s njom, no općenito na višim položajima, od 200 do 1500 m nadmorske visine (1). To je nizak, busenasti grmić (8–15 cm) četverobridnih, golih grana. Listovi su linearno kopljasti, slični listovima prethodne vrste, samo su na naličju žljezdaste točke, a najgornji često završavaju bodljicom. Po 2 do 5 cvjetova združeno je u kratki i gusti cvat poput klasa. Čaška je većinom ljubičaste boje, s istaknutim žilama. Vjenčić je crvenoljubičast, gornja je usna zaobljena, a donja s okruglim režnjevima i crvenoljubičastom šarom. Cvate od kolovoza do listopada.



Satureja subspicata Bartl. ex Vis.

Većina kemijskih istraživanja *Satureja* vrsta odnosi se na analizu eteričnog ulja kojeg karakterizira varijabilnost sadržaja i sastava. Eterično ulje vrste *S. montana* s područja naše zemlje pokazuje sljedeći sastav, odnosno udio glavnih komponenata: karvakrol i/ili timol (50–60 %), p-cimen (2–20 %), gamma-terpinen (2–15 %), bornilacetat (2–5%) (3, 4, 5). Vrsta *S. subspicata* sadrži znatno manju količinu eteričnog ulja u odnosu na prethodnu vrstu, a glavne komponente su: karvakrol (22 %), bornilacetat (14 %), timol (8 %), te metileugenol, terpinolen i kariofilen (po 6 %) (3).

Osim eteričnog ulja, za vrste roda *Satureja* karakteristične sastavnice su flavonoidi, pretežito glikozidi luteolina i apigenina (6, 7) te lipofilni metoksilavoni (8), potom ursolna, kavena i rozmarinska kiselina (9).

Listovi *Satureja* vrsta upotrebljavaju se u pučkoj medicini kod probavnih tegoba kao stomahik i karminativ, potom za izlučivanje vode i znoja, protiv kašlja i proljeva, za poticanje menstruacije i jačanje spolnog nagona. Znanstveno su dokazani antimikrobni (10, 11, 12), diuretски (13), antioksidativni (14) i anti-HIV-1 učinci (15).

Poredbena istraživanja srodnih biljnih vrsta, podvrsta i varijeteta koristan su doprinos botaničkoj taksonomiji polimorfnih rodova kao što je rod *Satureja*, a istodobno njima se utvrđuju identifikacijske odrednice onih biljnih dijelova koji se, bilo kao učinkovite droge, bilo patvorine, mogu naći u sastavu čajeva i drugih pripravaka. U ovome radu iznosimo rezultate ispitivanja anatomske obilježja te kromatografske analize bioaktivnih sastavnica vrsta *S. montana* subsp. *montana* i *S. subspicata* subsp. *liburnica*.

EKSPERIMENTALNI DIO

Biljni materijal

Istraživanju su podvrgnuti na zraku osušeni vršni dijelovi biljnih vrsta *Satureja montana* L. subsp. *montana* i *Satureja subspicata* Bartl. ex Vis. subsp. *liburnica* s područja srednjeg Velebita.

Biljni materijal identificiran je na temelju morfoloških obilježja, u usporedbi s literaturnim podacima (1, 2).

Anatomska ispitivanja

Ispitivanja anatomskih obilježja provedena su na poprečnim i/ili površinskim prerezima lista i stabljike. Polutrajni mikroskopski preparati pripremljeni su tako da su ručno izrađeni prerezi uklopljeni u kap glicerola i lužine na objektom staklu, pokriveni pokrovnim staklom i kratko zagrijani na plamenu. Mikroskopska analiza i snimanje prereza obavljani su pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus System Model BX50 povezanog s kamerom i računalom.

Kromatografska ispitivanja

Priprava ekstrakta

Ekstrakcija 1 g smljevenih listova provedena je zagrijavanjem s 10 mL metanola na vodenoj kupelji uz povratno hladilo (15 minuta). Nakon hlađenja i filtriranja, obavljena je kvalitativna analiza bioaktivnih sastavnica ekstrakata metodom tankoslojne kromatografije.

Ispitivanje flavonoida

Metanolni ekstrakti kromatografirani su na tankom sloju Kieselgela 60 F₂₅₄ uz pokretnu fazu etilacetat – mravlja kiselina – voda u volumnim omjerima 8:1:1 (16). Odijeljene supstancije detektirane su nakon prskanja kromatograma modificiranim Naturstoff-reagensom (NST/PEG) promatranjem pod UV svjetlom na 365 nm (17).

Ispitivanje fenolnih kiselina

Dokazivanje i karakterizacija fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima listova ispitivanih biljnih uzoraka provedeni su tankoslojnom kromatografijom uz primjenu pokretne faze etilacetat – octena kiselina 95:5 (V/V) (18). Nakon prskanja NST/PEG reagensom, kromatogrami su promatrani pod UV svjetlom (365 nm).

Ispitivanje triterpena i sterola

Prisutnost sterola i triterpena ispitana je odjeljivanjem metanolnih ekstrakata na tankom sloju silikagela pomoću pokretne faze benzen – aceton 9:1 (V/V). Detekcija je provedena nakon prskanja kromatograma klorsulfonskom kiselinom i zagrijavanja na 105 °C.

Ispitivanje sastavnica eteričnog ulja

Za kromatografsku analizu sastavnica eteričnog ulja u metanolnim ekstraktima primjenjena je pokretna faza toluen – etilacetat 93:7 (V/V), a za detekciju reagens vanilin-sulfatna kiselina (17).

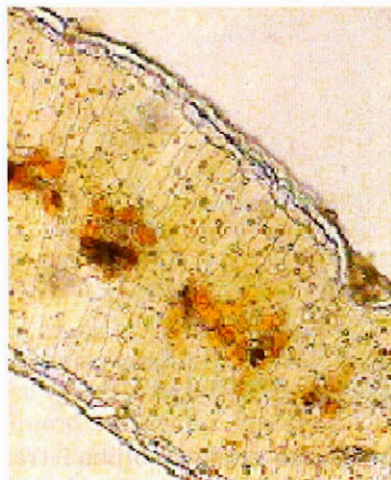
REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati anatomskih ispitivanja

Mikroskopskom analizom poprečnih prereza listova vrsta *S. montana* (slika 1) i *S. subspicata* (slika 2) uočena je atipična dorziventralna građa karakteristična za heliofitne vrste. Prema naličju lista, uz gusti spužvasti parenhim, pojavljuju se slojevi kraćih palisadnih stanica. Epidermske stanice obiju biljnih vrsta su poligonalne, imaju valovitu, čvorasto odebljalu stijenku i ispruganu debelu kutikulu. U udubljenjima epiderme smještene su višestanične žlijezde svojstvene biljkama iz porodice *Lamiaceae*. Male glavičaste žlijezde, građene od jednostaničnog drška i jednostanične glavice (slika 3), nalazimo na listovima obiju vrsta, ali u većem broju na listovima vrste *S. subspicata*. Na površinskom prerezu lista vrste *S. montana* uočen je veći broj velikih žlijezda građenih od drška i glavice s više od dvanaest žlijezdanih stanica koje formiraju rozetu (slika 4). Za razliku od navedenog, na listovima vrste *S. subspicata* velike su žlijezde znatno manje zastupljene, a glavica je građena od osam stanica. Puči su diacitične (slika 5). Od ostalih epidermskih tvorevina, na listovima obiju vrsta uočene su papile, te jednostanične i dvo-stanične dlake bradavičaste kutikule (slike 6, 7 i 8). Međutim, zastupljenost



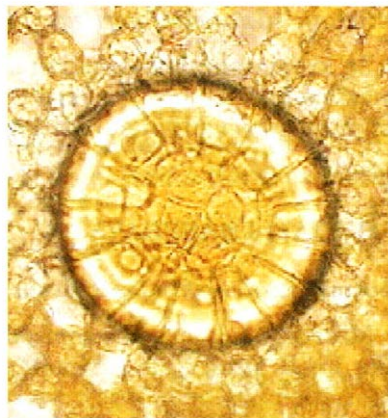
Slika 1. Poprečni prerez lista vrste
S. montana



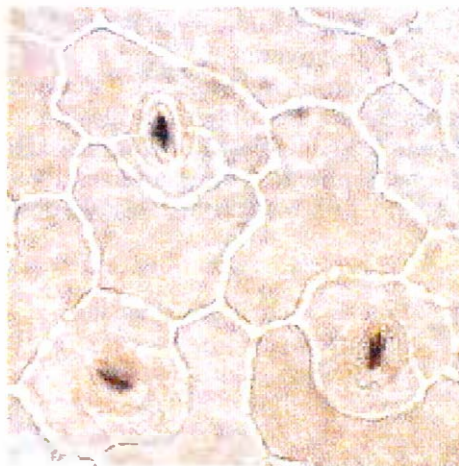
Slika 2. Poprečni prerez lista vrste
S. subspicata



Slika 3. Mala žlijezda tipa porodice *Lamiaceae*



Slika 4. Velika žlijezda na listu vrste *S. montana*



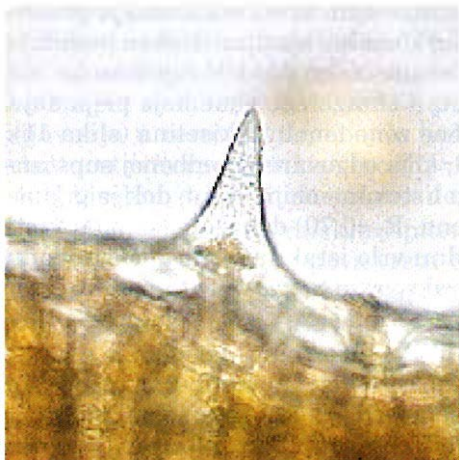
Slika 5. Diacitične puči



Slika 6. Papile

pojedinih vrsta dlaka nije jednaka, pa se i to može smatrati još jednim razlikovnim obilježjem. Na listu vrste *S. montana* opaža se veći broj jednostaničnih i dvostaničnih dlaka, te manji broj papila, dok su na epidermi manje dlakavog lista vrste *S. subspicata* brojnije papile i jednostanične dlake.

Anatomska građa stabljika istraživanih vrsta roda *Satureja* općenito odgovara građi stabljike usnača. Četverobridnu stabljiku učvršćuju četiri kolenhimska rebra, koja su jače izražena u vrste *S. subspicata* (slika 9). Za razliku od gole stabljike vrste *S. subspicata*, na stabljici vrste *S. montana* uočavaju se



Slika 7. Jednostanična dlaka

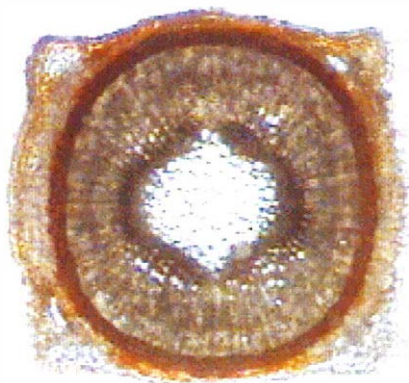


Slika 8. Dvostanične dlake

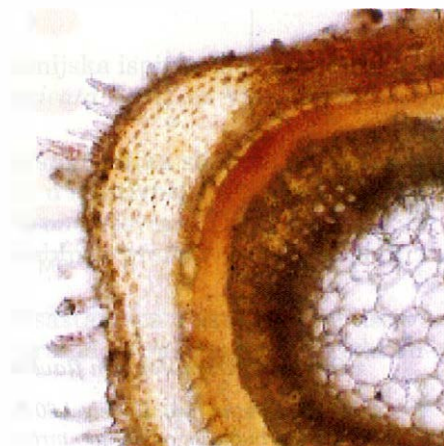
brojne jednostanične i višestanične pokrovne dlake s bradavičastom kutikulom (slika 10).

Rezultati kromatografskih ispitivanja

Metodom kromatografije na tankom sloju silikagela provedena je kemijska karakterizacija listova istraživanih biljnih vrsta roda *Satureja* glede prisutnosti flavonoida, fenolnih kiselina, triterpena i sterola te sastavnica eteričnog ulja.



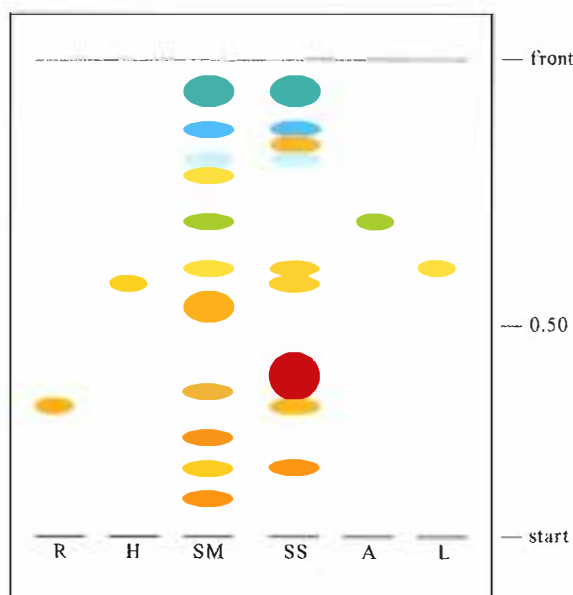
Slika 9. Poprečni prerez stabljike vrste *S. subspicata*



Slika 10. Poprečni prerez stabljike vrste *S. montana*

U metanolnim ekstraktima listova istraživanih vrsta dokazana je prisutnost većeg broja flavonoidnih glikozida kao i fenolne kiseline. Nakon prskanja kromatograma NST/PEG reagensom i promatranjem pod UV svjetlom na 365 nm, uočene su fluorescirajuće narančaste i žutozelene zone koje pripadaju flavonoidima, te svijetloplave i plavozelene zone fenolnih kiselina (slika 11). Žutonarančasta zona R_F vrijednosti 0,61, koja odgovara poredbenoj supstanciji luteolin-7-glukozidu, detektirana je u listovima obje vrste, dok je prisutnost apigenin-7-glukozida (žutozelena zona, $R_F=0,70$) dokazana samo u vrsti *S. montana*. Navedena vrsta sadrži i jednu vrlo istaknutu narančastu zonu R_F vrijednosti 0,51. S druge strane, ekstrakt vrste *S. subspicata* posebice karakterizira prisutnost velike crvenoljubičaste zone ($R_F=0,34$) koja prema literaturnim podacima odgovara eriocitrinu (17).

Na kromatogramu prikazanom na slici 11 također je vidljivo da obje vrste sadrže sastavnicu plavozelene fluorescencije ($R_F=0,95$) koja se nalazi u području kavene i ružmarinske kiseline. Radi preciznije karakterizacije provedeno je odjeljivanje fenolnih kiselina pomoću pokretne faze etilacetat – octena kiselina (95:5). Na temelju karakteristične boje fluorescencije i R_f vrijednosti



Slika 11. Kromatogram flavonoida vrsta *S. montana* i *S. subspicata*

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F_{254}

Pokretna faza: etilacetat - mravlja kiselina - voda 8:1:1 (V/V/V)

Detekcija: NST/PEG, UV-365 nm

SM – metanolni ekstrakt listova vrste *S. montana*

SS – metanolni ekstrakt listova vrste *S. subspicata*

R – rutin ($R_F=0,31$), H – hiperozid ($R_F=0,57$),

A – apigenin-7-glukozid ($R_F=0,70$), L – luteolin-7-glukozid ($R_F=0,61$)

dokazano je da istraživane vrste sadrže i kavenu i ružmarinsku kiselinu.

Prisutnost triterpena i sterola u listovima vrsta *S. montana* i *S. subspicata* također je kromatografski dokazana. Na tankom sloju adsorbensa odijeljeno je pet zona koje su se, nakon prskanja klorsulfonskom kiselinom i zagrijavanja u termostatu, obojile ljubičasto. U oba ekstrakta dokazana je prisutnost triterpenske kiseline ($R_f=0,15$) koja kromatografski odgovara ursolnoj kiselini, dok β -sitosterol nije detektiran.

U okviru kromatografskih ispitivanja provedena je i poredbena analiza metanolnih ekstrakata listova vrsta *S. montana* i *S. subspicata* glede prisutnosti monoterpenkih fenolnih spojeva koji dolaze u sastavu eteričnih ulja ovih vrsta. Za odjeljivanje je primijenjen sustav otapala toluen – etilacetat (93:7), a za detekciju reagens vanilin – sulfatna kiselina. Na kromatogramu ekstrakta vrste *S. montana* ističe se crvenoljubičasta zona ($R_f=0,64$) u području poredbenih supstancija timola i karvakrola, koji se uz primijenjene kromatografske uvjete ne mogu odijeliti. Prijašnja analiza sastava eteričnog ulja vrste *S. montana*, provedena metodom plinske kromatografije, pokazala je da je u toj frakciji glavna komponenta karvakrol (3). Na temelju veličine i intenziteta obojenja te zone moglo se pretpostaviti da je sadržaj ovih fenolnih spojeva znatno manji u listovima vrste *S. subspicata*, što je također u korelaciji s rezultatima navedene analize.

U ekstraktima istraživanih vrsta roda *Satureja* kromatografskim je ispitivanjem dokazana prisutnost flavonoida, fenolnih kiselina, triterpenske ursolne kiseline i monoterpenkih fenola. S obzirom na različite kromatografske slike flavonoidnih sastavnica, zaključeno je da se upravo sustav za odjeljivanje i detekciju tih spojeva može primijeniti za identifikaciju listova, odnosno dokazivanje u biljnim pripravcima vrsta *S. montana* i *S. subspicata*.

ZAKLJUČAK

Provedena su usporedna anatomska i kemijska ispitivanja vrsta *Satureja montana* L. subsp. *montana* i *Satureja subspicata* Bartl. ex Vis. subsp. *liburnica*.

Mikroskopska analiza pokazala je da postoji velika sličnost anatomskih obilježja listova i stabljika. Uočene su razlike u relativnoj zastupljenosti pojedinih vrsta pokrovnih dlaka te građi žlijezda na listovima. Osim toga, za razliku od gole stabljike vrste *S. subspicata*, stabljiku vrste *S. montana* prekrivaju brojne pokrovne dlake.

Utvrđeno je da se analizom flavonoidnih sastavnica u ekstraktima listova mogu, na temelju karakterističnih kromatograma, istraživane vrste roda *Satureja* jednostavno i pouzdano razlikovati.

Literatura – References

1. S. *Forenbacher*, Velebit i njegov biljni svijet, Školska knjiga, Zagreb, 1990, 586.
2. Č. *Šilić*, Monografija rodova *Satureja* L., *Callamintha* Miller, *Micromeria* Benth., *Acinos* Miller, *Clinopodium* L. u flori Jugoslavije, Svjetlost, Sarajevo, 1979, 32.
3. G. *Stanić*, J. *Petričić*, N. *Blažević*, J. *Essent. Oil Res.* **3** (1991) 153.
4. D. *Kuštrak*, J. *Kuftinec*, N. *Blažević*, M. *Maffei*, J. *Essent. Oil Res.* **8** (1996) 7.
5. J. *Mastelić*, I. *Jerković*, *Food Chem.* **80** (2003) 135.
6. N. *Darbour*, A. *Proliae*, F. *Baltassat*, J. *Raynaud*, *Int. J. Pharmacogn.* **34** (1996) 76.
7. N. *Darbour*, F. *Baltassat*, J. *Raynaud*, J. *Pellecuer*, *Pharm. Acta Helv.* **65** (1990) 239.
8. F. A. *Tomas-Barberan*, S. Z. *Husain*, M. J. *Gil*, *Biochem. Syst. Ecol.* **16** (1987) 43.
9. I.c. iz R. *Hegnauer*, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Band IV, Birkhauser Verlag, Basel und Stuttgart, 1964, 297.
10. R. *Piccaglia*, M. *Marotti*, et al, *Ind. Crops Prod.* **2** (1993) 47.
11. S. *Pepeljnjak*, G. *Stanić*, P. *Potočki*, *Acta Pharm.* **49** (1999) 65.
12. S. C. *Chao*, D. G. *Young*, C. J. *Oberg*, J. *Essent. Oil Res.* **12** (2000) 639.
13. G. *Stanić*, I. *Samaržija*, *Phytother. Res.* **7** (1993) 363.
14. A. *Radošević*, M. *Miloš*, *Free Radical Res.* **37** (2003) 673.
15. K. *Yamasaki*, M. *Nakano*, et al, *Biol. Pharm. Bull.* **21** (1998) 829.
16. M. *Luckner*, O. *Bessler*, R. *Luckner*, *Pharmazie* **20** (1965) 681.
17. H. *Wagner*, S. *Bladt*, E. M. *Zgajnski*, *Drogenanalyse*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1983.
18. E. *Stahl*, W. *Schild*, *Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1986.

Primljeno 19. IX. 2004