

Istraživanje flavonoida i aminokiselina brnistre – *Spartium junceum* L. (Fabaceae)

ŽELJAN MALEŠ¹, MIŠKO PLAZIBAT³, VJERA BILUŠIĆ VUNDAĆ¹,
DARIO KREMER², JELENA ALAR¹

¹Zavod za farmaceutsku botaniku s ²Farmaceutskim botaničkim vrtom »Fran Kušan«
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb i ³Botanički zavod
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Investigation of flavonoids and amino acids of Spanish broom – *Spartium junceum* L. (Fabaceae)

S u m m a r y – *Spartium junceum* L. or Spanish broom is a shrub that can reach up to five meters tall, with erect, round, bright green, almost leafless stems. It is the only species of this genus native to the Mediterranean region and Canary Islands which grows in areas with full sun and limited water in poor, rocky soils.

Thin-layer chromatographic analysis of flavonoids and phenolic acids in the stem, leaves and flowers of *S. junceum* collected from five separated geographic locations of Croatia showed the presence of quercetin, caffeic acid, quercitrin, isoquercitrin and hyperoside. Leaves contained the highest content of flavonoids (0.35%).

Thin-layer chromatographic analysis of amino acids in the investigated plant parts showed the presence of 8 amino acids: leucine, phenylalanine, γ -amino-butyric acid, tyrosine, proline, glutamine, serine and histidine.

⁽¹⁾Department of Pharmaceutical Botany with ⁽²⁾Pharmaceutical Botanical Garden »Fran Kušan«, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia and ⁽³⁾Department of Botany, Faculty of Science, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia).

UVOD

Vrsta *Spartium junceum* L. (*brnistra*, *žuka*) pripada porodici *Fabaceae* (= *Leguminosae*, *Papilionaceae*). U stranoj literaturi može se naći i pod slijedećim nazivima: Spanish broom, genêt d'Espagne, spanischer Ginster, ginestra, gayomba.

Vrijeme cvjetanja brnistre ovisi o geografskom smještaju, a u Hrvatskoj je najizrazitije u lipnju i srpnju. Lako podnosi sušu i buru, dok je osjetljiva prema jačoj hladnoći. Iz vlakana kore prave se mreže i konopci, a mlade grančice se upotrebljavaju u različite svrhe (metle, košare, otirači, za vezivanje vinove loze i dr.).

U slučaju predoziranja brnistrom može doći do povraćanja, pojačanog čišćenja crijeva i bubrežne iritacije. Sjeme se umjereno koristilo kod vodene bolesti u obliku tinkture.

Svrha ovog rada bilo je istraživanje kemijskog sastava biljke koje se odnosilo na ispitivanje prisutnosti flavonoida i aminokiselina, te na kvantitativnu analizu flavonoida. Korišteni uzorci prikupljeni su na području Zagreba (Farmaceutski botanički vrt »Fran Kušan«), Zadra, Boraje, Solina i Splita za vrijeme cvatnje.

BOTANIČKI PODACI

U okviru botaničkih podataka prikazana su morfološka obilježja te rasprostranjenost i prirodna staništa brnistre.

1. Morfološka obilježja brnistre – *S. junceum*

Vrsta *Spartium junceum* je vrlo razgranat, 1–2 (–5) m visok grm sa gustim, uspravnim, šibolikometličastim, zelenkastim ograncima, koji su okruglasti i plitko izbrazdani (*Slika 1.*). Brnistra je jednodomna, dvospolna i kserofitna biljka. Cvjetovi su zigomorfni, u rahlim vršnim grozdovima, na tankim peteljka, 2–2,5 cm dugi, nalik na leptira.



Slika 1. *Spartium junceum* L. – brnistra



Slika 2. Ogranak, listovi, cvjetovi i plod brnistre

Gornja latica je najveća i čini »zastavicu« ili »jedarce« (*vexillum*), dvije postrane obrazuju »krila« (*alae*), a dvije najdonje su donjim rubom djelomično srasle tvoreći »lađicu« (*carina*). Imaju deset prašnika, koji su filamentima srasli u cijev koja obavija vrat tučka (*stylus*). Lapovi čaške su srasli, a pri vrhu imaju 5 kratkih zubaca. Cvjetovi ugodno mirišu. Listovi su lancetasti (2–4 cm dugi i 1–1,5 cm široki), cjelovitog ruba, gotovo sjedeći, malobrojni, u sušnom periodu otpadaju. Plod je oko 4–8 cm duga i 0,5–0,8 cm široka, sivocrna, sjajna mahuna, koja se uzdužno otvara s dva zaklopca (Slika 2.). Sadrži 6–18 sjemenaka, koje su okruglasto jajaste, kestenjasto-žute boje i sjajne. Pupovi su spiralno raspoređeni, međusobno jako udaljeni, zaštićeni bazom lista. Stablo sa žuto-zelenkastom korom kao i grane imaju 1–2 sloja palisadnog asimilacijskog parenhima, koji je naročito koristan zbog asimilacije nakon otpadanja listova. Korijenski sustav je dobro razvijen, štiti tlo od erozije i obogaćuje zemljište nitratima posredstvom bakterija korijenskih gomoljčića (2).

2. Prirodna staništa i rasprostranjenost brnistre

Brnistra raste u makiji, garizima i po kamenjaru, od vazdazelenih primorskih do listopadnih kraških šuma. Nema velikih zahtjeva u pogledu kvalitete zemljišta, ali je najbujnija na svježim tlima (2).

Vrsta *S. junceum* rasprostranjena je u mediteranskoj regiji, pretežno uz obale Sredozemnog mora te u jugozapadnoj Europi. Raširila se u mnogim dijelovima svijeta izvan svoga prirodnog areala (sjeverna i južna Amerika, južna Afrika, Azija, Australija). U Hrvatskoj raste u primorskom dijelu, uzduž obale i na otocima (Slika 3.).



Slika 3. Rasprostranjenost brnistre

KEMIJSKI PODACI

Brnistra ima vrlo raznolik kemijski sastav. Cvjetovi i sjemenke sadrže citizin, spartein i druge alkaloidne. Pokazalo se da spartein izoliran iz stabljike ima analeptički učinak na mišićni sustav. Brnistra sadrži također i orientin, skoparozid, flavonolski aglikon kvercetin, dva flavonoidna derivata luteolina, kavenu kiselinu, antocijane, eterična ulja, trjeslovine i β -amyrin. Skoparozid izoliran iz cvjetova glavni je nositelj diuretskog djelovanja. Saponin spartitriozid, također izoliran iz cvjetova, ima jaku antiulcerogenu aktivnost. GC/MS analiza eteričnog ulja pokazala je da se sastoji uglavnom od monoterpenskih ugljikovodika s α -tujenom kao glavnom sastavnicom (3, 4).

EKSPERIMENTALNI DIO

Materijal za istraživanje

Biljni materijal je skupljen na više nalazišta: Zagreb – Farmaceutski botanički vrt »Fran Kušan«, Solin, Zadar, Boraja i Split. Sastojao se od listova, stabljike i cvjetova brnistre – *S. junceum* (Tablica 1.).

Tablica 1. Podaci o istraživanim uzorcima

| Oznaka uzorka | Vrsta uzorka | Nalazište | Datum sakupljanja |
|----------------|--------------|---------------------|-------------------|
| L ₁ | List | Zagreb – "F. Kušan" | 2. 6. 2004. |
| S ₁ | Stabljika | Zagreb – "F. Kušan" | 2. 6. 2004. |
| C ₁ | Cvijet | Zagreb – "F. Kušan" | 2. 6. 2004. |
| S ₂ | Stabljika | Solin | 6. 6. 2004. |
| C ₂ | Cvijet | Solin | 6. 6. 2004. |
| S ₃ | Stabljika | Zadar | 7. 6. 2004. |
| C ₃ | Cvijet | Zadar | 7. 6. 2004. |
| S ₄ | Stabljika | Boraja | 13. 6. 2004. |
| C ₄ | Cvijet | Boraja | 13. 6. 2004. |
| S ₅ | Stabljika | Split | 10. 7. 2004. |
| C ₅ | Cvijet | Split | 10. 7. 2004. |

1. Identifikacija biljnog materijala

Identitet istraživane biljne vrste izvršen je u Zavodu za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i potvrđen je ispitivanjem vanjske i unutarnje građe skupljenih uzoraka.

2. Istraživanje prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina tankoslojnom kromatografijom

Istraživanju su podvrgnuti metanolni ekstrakti stabljike, listova i cvjetova brnistre. Kao poredbene supstancije primjenjeni su flavonoidi: kvercetin, kvercitrin, izokver-

citrin, hiperozid i rutin te kavena i klorogenska kiselina kao fenolne kiseline. Korištene su kao 0,05%-tne metanolne otopine.

Ekstrakti su pripremljeni tako da je 1 g praškasto usitnjenog uzorka ekstrahirano s 10 ml metanola 5 minuta na vodenoj kupelji kod 60 °C. Bistri filtrat nakon hlađenja, služio je kao otopina za kromatografsko ispitivanje (5a).

Ispitivanje prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina provedeno je na tankom sloju Kieselgela 60 F₂₅₄, uz smjesu otapala: etilacetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:26 V/V/V/V) (5a).

Ekstrakti su nanoseni na nepokretnu fazu u količini od 5 µl, a poredbene supstancije u količini od 2 µl. Detekcija odijeljenih flavonoida i fenolnih kiselina 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 je specifičan reagens za detekciju flavonoida. Obojenja nastaju odmah, a uvjetovana su samom strukturom flavonoidnih spojeva (5a).

3. Određivanje količine flavonoida

Kvantitativna analiza flavonoida u stabljici, listovima i cvjetovima brnistre provedena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (6), koja se temelji na određivanju ukupnih flavonoidnih aglikona nakon stvaranja kompleksa s Al³⁺ u smjesi metanola, etilacetata i octene kiseline. Količina flavonoida u svim uzorcima određena je tri puta, a iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

4. Istraživanje prisutnosti aminokiselina tankoslojnom kromatografijom

Za ispitivanje su primjenjeni vodeni ekstrakti stabljike, listova i cvjetova brnistre.

Ekstrakti su pripremljeni tako da je 1 g praškasto usitnjenog biljnog materijala ekstrahirano s 10 ml vode, 1 sat na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Ohlađeni bistri filtrat služio je kao otopina za ispitivanje. Kao poredbene supstancije korištene su 0,00001%-tne vodene otopine fenilalanina (Phe), γ-aminomaslačne kiseline (Gaba), glutamina (Gln), histidina (Hys), leucina (Leu), lizina (Lys), metionina (Met), prolina (Pro), serina (Ser), tirozina (Tyr), triptofana (Trp) i valina (Val).

Ispitivanje prisutnosti aminokiselina provedeno je na tankom sloju celuloze F.

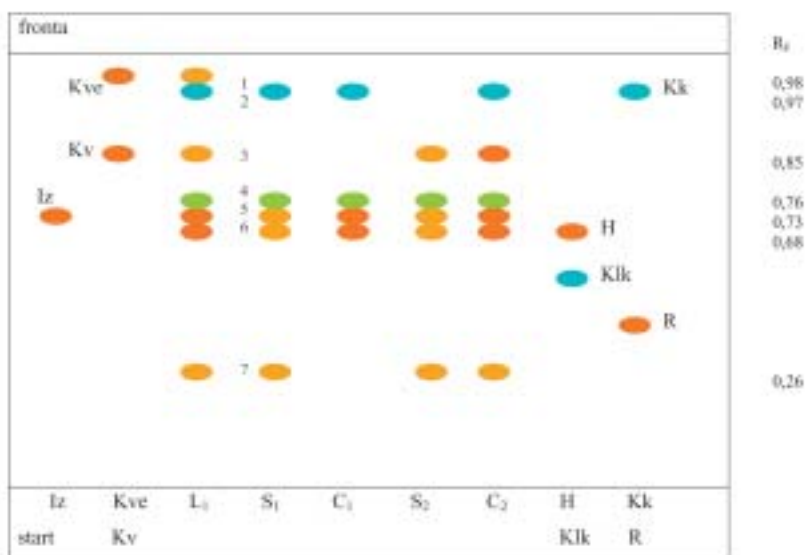
Kao pokretna faza primjenjena je smjesa otapala n-butanol-aceton-ledena octena kiselina-voda (35:35:10:20 V/V/V/V) (5b, 7–13).

Detekcija odijeljenih aminokiselina provedena je nakon prskanja kromatograma ninhidrin reagensom i grijanja na 100 °C, 5 do 10 minuta. Ninhidrin reagens specifičan je reagens za detekciju aminokiselina. Obojenja postaju vidljiva grijanjem na 100 °C (14).

REZULTATI I RASPRAVA

Kvalitativna analiza flavonoida

Tankoslojnom kromatografijom istražena je prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina tako što su prethodno pripremljeni uzorci za kromatografiju, odnosno metanolni ekstrakti listova, stabljike, i cvjetova brnistre s pet nalazišta. Vrijeme razvijanja kromatograma u prosjeku je trajalo dva do tri sata. Kao pokretna faza je korištena smjesa otapala: etilacetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:26 V/V/V/V). Suhe kromatografske ploče prskane su NST/PEG reagensom i promatrane pod UV zračenjem na 365 nm, nakon čega su uočene narančaste, zelenožute i plave fluorescencije.



Slika 4. Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina brnistre –
uzorci iz Farm. botaničkog vrta »Fran Kušan« (L₁, S₁ i C₁) i Solina (S₂ i C₂)

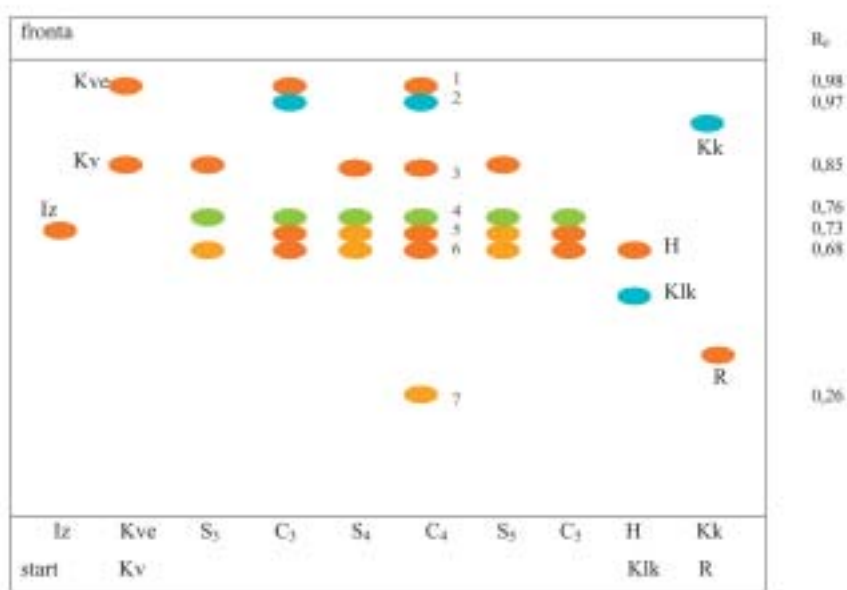
Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄

Pokretna faza: etilacetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda
(100:11:11:26 V/V/V/V)

Detekcija: NST/PEG (UV–365 nm)

- Iz-izokvercitrin
- Kve-kvercetin
- Kv-kvercitrin
- H–hiperozid
- Klk-klorogenska kiselina
- Kk-kavena kiselina
- R-rutin

Zbog brojnosti uzoraka (jedanaest) korištene su dvije kromatografske ploče (Slike 4. i 5.). Uzorak lista (L_1) ima sedam mrlja. Broj mrlja kod uzoraka cvjetova varira od tri (C_3) do sedam (C_4). Kod uzoraka stabljike, broj mrlja varira od tri (S_3) do pet (S_1 i S_2). Usporedbom fluorescencija mrlja i R_F vrijednosti sastavnica ekstrakata i poredbenih supstancija vidljivo je da sastavnica 1 narančaste fluorescencije ($R_F = 0,98$) odgovara kvercetinu, sastavnica 2 plave fluorescencije ($R_F = 0,97$) odgovara kavenoj kiselini, sastavnica 3 narančaste fluorescencije ($R_F = 0,85$) odgovara kvercitrinu, sastavnica 5 narančaste fluorescencije ($R_F = 0,73$) odgovara izokvercitrinu, a sastavnica 6 narančaste fluorescencije ($R_F = 0,68$) odgovara hiperozidu. Hiperozid je prisutan u svim uzorcima, dok izokvercitrin nije utvrđen samo u uzorku S_3 . Sastavnica 4 zelenkaste



Slika 5. Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina brnistre – uzorci iz Zadra (S_3 i C_3), Boraje (S_4 i C_4) i Splita (S_5 i C_5)

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄

Pokretna faza: etilacetat-mravljja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:26 V/V/V/V)

Detekcija: NST/PEG (UV–365 nm)

- Iz-izokvercitrin
- Kve-kvercetin
- Kv-kvercitrin
- H-hiperozid
- KIk-klorogenska kiselina
- Kk-kavena kiselina
- R-rutin

fluorescencije ($R_F = 0,76$) i sastavnica 7 narančaste fluorescencije ($R_F = 0,26$) mogle bi pripadati flavonoidima. Može se uočiti da su uzorci cvijeta intenzivnijeg obojenja od uzoraka lista i stabljike.

Kvantitativna analiza flavonoida

Kvantitativna analiza flavonoida provedena je metodom prema Christu i Mülleru, a rezultati su prikazani u tablici 2.

Tablica 2. Količina flavonoida u istraživanim uzorcima

| Nalazište | Uzorak | % Flavonoida ($\bar{X} \pm S_D$) |
|-----------------------|----------------|---------------------------------------|
| ZAGREB - "FRAN KUŠAN" | L ₁ | 0,35 ± 0,002 |
| ZAGREB - "FRAN KUŠAN" | S ₁ | 0,18 ± 0,013 |
| ZAGREB - "FRAN KUŠAN" | C ₁ | 0,15 ± 0,004 |
| SOLIN | S ₂ | 0,15 ± 0,007 |
| SOLIN | C ₂ | 0,16 ± 0,004 |
| ZADAR | S ₃ | 0,14 ± 0,006 |
| ZADAR | C ₃ | 0,23 ± 0,017 |
| BORAJA | S ₄ | 0,05 ± 0,040 |
| BORAJA | C ₄ | 0,16 ± 0,011 |
| SPLIT | S ₅ | 0,08 ± 0,004 |
| SPLIT | C ₅ | 0,11 ± 0,001 |

Kvantitativna analiza flavonoida brnistre pokazala je da istraživani uzorci sadrže 0,08-0,35% flavonoida. S obzirom na vrijeme skupljanja može se uočiti da količina flavonoida lagano opada prema kraju cvatnje, tj. najveći postotak flavonoida imaju uzorci iz Farmaceutskog botaničkog vrta »Fran Kušan«, a najmanji uzorci iz Boraje i Splita. Treba naglasiti da taj pad nije previše zamjetan, jer količine variraju.

Ako se usporede pojedini biljni organi (listovi, stabljika, cvjetovi), može se uočiti da listovi sadrže najveću količinu flavonoida (0,35%), dok stabljika i cvjetovi imaju slične vrijednosti u uzorcima iz Zagreba, Solina i Splita, a uzorci cvjetova skupljeni u Zadru i Boraji imaju veću količinu flavonoida u odnosu na stabljiku.

Kvalitativna analiza aminokiselina

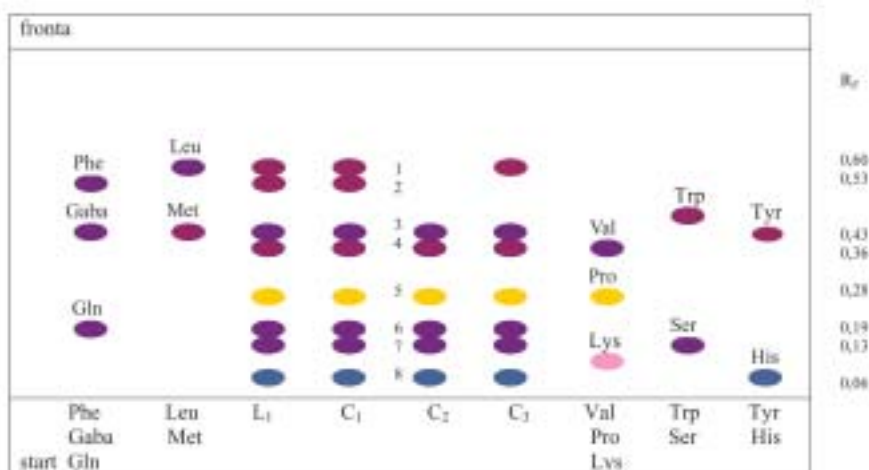
Vodeni ekstrakti listova, cvjetova i stabljike brnistre podvrgnuti su ispitivanju na prisutnost aminokiselina tankoslojnom kromatografijom. Kao mobilna faza primjenjena je smjesa otapala: n-butanol-aceton-ledena octena kiselina-voda (35:35:10:20 V/V/V/V) na nepokretnoj fazi celuloze F.

Kromatogram je prskan ninhidrin reagensom te grijan na 100 °C kroz 10 minuta. Uočeno je 8 mrlja ljubičastog, plavog i žutog obojenja (*Slike 6.– 8.*). Usporedbom R_F

vrijednosti nastalih i poredbenih mrlja, vidljivo je da ljubičasta obojenja mrlja 1, 2, 3, 4, 6 i 7 odgovaraju leucinu (Leu), fenilalaninu (Phe), γ -aminomaslačnoj kiselini (Gaba), tirozinu (Tyr), glutaminu (Gln) i serinu (Ser). Žuto obojenje mrlje 5 odgovara prolinu (Pro), a plavosivo obojenje mrlje 8 odgovara histidinu (His).

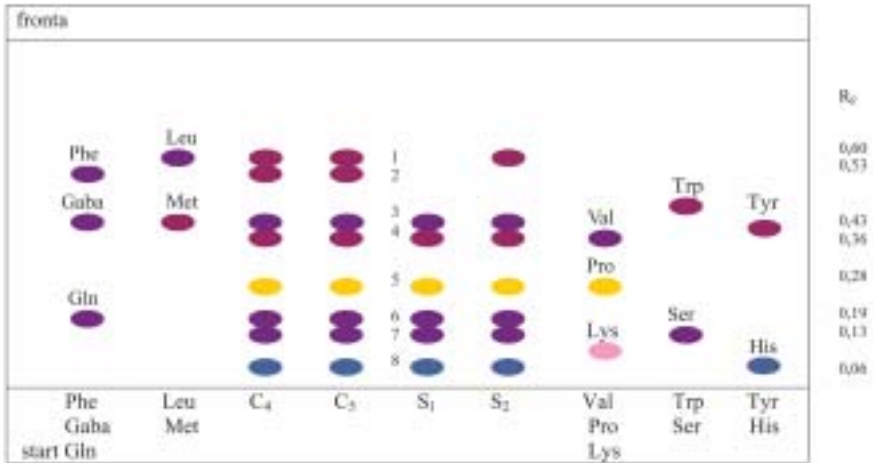
Usporedbom intenziteta obojenja odijeljenih aminokiselina može se vidjeti da svi uzorci sadrže leucin i fenilalanin u manjim količinama.

Uzorak lista ima 8 mrlja. Svi uzorci cvjetova imaju 8 mrlja osim uzorka C₂ koji ima 6, te uzorka C₃ koji ima 7 mrlja. Uzorci stabljike imaju 6 (S₁ i S₃), 7 (S₂) ili 8 (S₃ i S₄) mrlja.



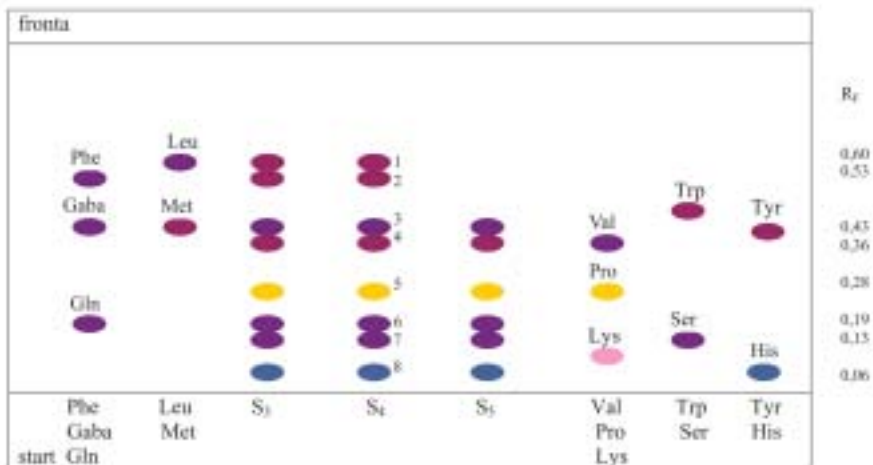
Slika 6. Kromatogram aminokiselina listova i cvjetova brnistre

- Nepokretna faza: celuloza F
- Pokretna faza: n-butanol-aceton-ledena octena kiselina-voda (35:35:10:20 V/V/V/V)
- Detekcija: ninhidrin reagens
- Phe = fenilalanin, Gaba = γ -aminomaslačna kiselina, Gln = glutamin, Leu = leucin, Met = metionin, Val = valin, Pro = prolin, Lys = lizin, Trp = triptofan, Ser = serin, Tyr = tirozin, His = histidin
- L₁ = vodeni ekstrakt lista iz Farm. botaničkog vrta "Fran Kušan"
- C₁ = vodeni ekstrakt cvijeta iz Farm. botaničkog vrta "Fran Kušan"
- C₂ = vodeni ekstrakt cvijeta iz Solina
- C₃ = vodeni ekstrakt cvijeta iz Zadra



Slika 7. Kromatogram aminokiselina cvjetova i stabljike brnistre

- Nepokretna faza: celuloza F
- Pokretna faza: n-butanol-aceton-ledena octena kiselina-voda (35:35:10:20 V/V/V/V)
- Detekcija: ninhidrin reagens
- Phe = fenilalanin, Gaba = γ -aminomaslačna kiselina, Gln = glutamin, Leu = leucin, Met = metionin, Val = valin, Pro = prolin, Lys = lizin, Trp = triptofan, Ser = serin, Tyr = tirozin, His = histidin
- C₄ = vodeni ekstrakt cvijeta iz Boraje
- C₅ = vodeni ekstrakt cvijeta iz Splita
- S₁ = vodeni ekstrakt stabljike iz Farm. botaničkog vrta "Fran Kušan"
- S₂ = vodeni ekstrakt stabljike iz Solina



Slika 8. Kromatogram aminokiselina stabljike brnistre

- Nepokretna faza: celuloza F
- Pokretna faza: n-butanol-aceton-ledena octena kiselina-voda (35:35:10:20 V/V/V/V)
- Detekcija: ninhidrin reagens
- Phe = fenilalanin, Gaba = γ -aminomaslačna kiselina, Gln = glutamin, Leu = leucin, Met = metionin, Val = valin, Pro = prolin, Lys = lizin, Trp = triptofan, Ser = serin
Tyr = tirozin, His = histidin
- S₃ = vodeni ekstrakt stabljike iz Zadra
- S₄ = vodeni ekstrakt stabljike iz Boraje
- S₅ = vodeni ekstrakt stabljike iz Splita

ZAKLJUČAK

Istraživanjem stabljike, listova i cvjetova brnistrice – *Spartium junceum* utvrđena je prisutnost flavonoida, fenolnih kiselina i aminokiselina.

Metodom tankoslojne kromatografije dokazana je prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina: kvercetina, kavene kiseline, kvercitrina, izokvercitrina i hiperozida. S obzirom na intenzitet obojenih mrlja može se zaključiti da stabljika, listovi i cvjetovi ne sadrže jednaku količinu flavonoida što je potvrđeno i kvantitativnim istraživanjem. Listovi su sadržavali najveću količinu flavonoida (0,35%).

Aminokiseline su također istražene metodom tankoslojne kromatografije. Aminokiselinski sastav bio je uvjetovan biljnim organom. Utvrđena je prisutnost leucina, fenilalanina, γ -aminomaslačne kiseline, tirozina, prolina, glutamina, serina i histidina.

Literatura – References

1. S. Horvatić, Ilustrirani bilinar, Školska knjiga, Zagreb 1954, 254.
2. Č. Šilić, Atlas drveća i grmlja, Svjetlost, Sarajevo 1983, 120.
3. H. A. Hoppe, Drogenkunde, Band 1, 8. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin-New York 1975, 1021.
4. N. Bezić, V. Dunkić, A. Radonić, Acta Biol. Cracov., Ser. Bot. **45** (2003) 43.
5. H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski, Drogenanalyse, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1983, a) 163, b) 288.
6. B. Christ, K. H. Müller, Arch. Pharm. **293** (1960) 1033.
7. Ž. Maleš, M. Plazibat, R. Petlevski, Farm. Glas. **57** (2001) 175.
8. Ž. Maleš, M. Plazibat, K. Hazler Pilepić, B. Cetina-Čižmek, Farm. Glas. **57** (2001) 257.
9. Ž. Maleš, M. Plazibat, K. Hazler Pilepić, V. Bilušić, Farm. Glas. **58** (2002) 155.
10. Ž. Maleš, M. Plazibat, V. Suban, Farm. Glas. **58** (2002) 287.
11. Ž. Maleš, M. Plazibat, A. Ujević Ivić, Farm. Glas. **58** (2002) 389.
12. Ž. Maleš, V. Bilušić Vundać, M. Plazibat, Farm. Glas. **59** (2003) 373.
13. Ž. Maleš, M. Plazibat, V. Bilušić Vundać, Farm. Glas. **60** (2004) 121.
14. H. K. Berry, C. Leonard, H. Peters, M. Granger, N. Chunekahira, Clin. Chem. **14** (1968) 1033.

Primljeno: 30.05.2005.