

Usporedno fitokemijsko istraživanje vrsta roda Thalictrum L.: T. flavum L., T. foetidum L., T. lucidum L., T. simplex L.

Vladimir-Knežević, Sanda; Nikolić, Toni

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2001, 57, 397 - 404**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:468969>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-09**



Repository / Repozitorij:

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



Usporedno fitokemijsko istraživanje vrsta roda *Thalictrum* L.: *T. flavum* L., *T. foetidum* L., *T. lucidum* L., *T. simplex* L.

SANDA VLADIMIR-KNEŽEVIĆ¹ i TONI NIKOLIĆ²

¹Zavod za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

²Botanički zavod Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Comparative phytochemical investigation of *Thalictrum* species: *T. flavum* L., *T. foetidum* L., *T. lucidum* L., *T. simplex* L.

S u m m a r y – Comparative investigation of biologically active compounds of *Thalictrum* species (*T. flavum* L., *T. foetidum* L., *T. lucidum* L. and *T. simplex* L.) was carried out. Alkaloids, saponins, sterols, triterpenes, pyrogallol tannins, flavonoids and phenolic acids were proved in the leaves of experimental cultivated plants from Croatia, Finland, France, Germany, Italy and Sweden. Rutin, quercitrin, isoquercitrin, chlorogenic, isochlorogenic and caffeic acids were identified in the methanolic extracts of leaves. Variations in the composition of flavonoids and phenolic acids between the investigated plants as well as between different specimens of the same species were observed.

(¹Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia, and ²Department of Botany, Faculty of Science, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia)

UVOD

Vrste roda *Thalictrum* L. (kozlačice) iz porodice *Ranunculaceae* spominju se u pučkoj medicini mnogih naroda. Primjerice, u 18. i 19. stoljeću Englezi, Amerikanci i Rusi rabili su vrstu *T. flavum* L. kao stomahik, purgativ, diuretik i sredstvo protiv groznice. Ruska pučka medicina preporučuje vrstu *T. minus* L. za liječenje groznice i zmijskih ujeda. Kinezi su vrstom *T. shensiense* W. T. Wang & S. H. Wang liječili bolesti dišnog sustava. *T. foliolosum* DC. i druge srodne vrste primjenjivale su se u Indiji i Japanu u različite svrhe. Rabljene su kao dijaforetici, antipiretici, stomahici, tonici, purgativi, za poboljšanje teka, pročišćavanje krvi i tretiranje zmijskih ujeda, zatim, u liječenju žutice, lepre, reumatizma, čireva, konjuktivitisa, gastritisa i mučnina u trudnoći. Američki Indijanci u Nevadi primjenjivali su vrstu *T. fendleri* Engelm. ex A. Gray u liječenju prehlada i gonoreje, dok su drugi Indijanci neke vrste roda *Thalictrum* rabili protiv zmijskih ujeda (1). Biljna vrsta *T. atriplex*

Finet et Gagnep. stari je kineski lijek za liječenje infektivnog hepatitisa, čireva, dizenterije i gastroenteralnih poremećaja (2).

Kemijska i biološka istraživanja vrsta roda *Thalictrum* obuhvatila su uglavnom alkaloidne, dok su drugi biološki aktivni spojevi slabo zastupljeni. To je potaknulo na istraživanje sljedećih vrsta: *Thalictrum flavum* L. (žuta kozlačica), *T. foetidum* L. (smrdljiva kozlačica), *T. lucidum* L. (svjetlucava kozlačica) i *T. simplex* L. (jednostavna kozlačica).

Iz tih biljnih vrsta izoliran je i identificiran veliki broj monomernih i dimernih alkaloida (1, 3–16) za koje je utvrđeno da imaju hipotenzivni, spazmolitički, sedativni (1, 4), antimikrobni (4), antiviralni i imunostimulirajući učinak (17). U vrsti *T. foetidum* identificirano je pet triterpenskih saponina (18–22). Utvrđena je prisutnost flavonoidnih glikozida rutina i ramnetin-3- β -D-glukopiranozida, te flavonoidnih aglikona: kvercetina, kemferola i flavescetina. Ti su aglikoni detektirani i u vrsti *T. flavum* (23), za koju je dokazano da djeluje antioksidativno zbog sadržaja α -tokoferola (24).

U ovom radu iznosimo rezultate usporednog fitokemijskog istraživanja navedenih vrsta roda *Thalictrum* koje su eksperimentalno uzgojene iz sjemena različitog europskog podrijetla. Kvalitativnu analizu alkaloida, saponina, triterpena, sterola, trjeslovina, flavonoida i fenolnih kiselina provodili smo tankoslojnom kromatografijom te reakcijama stvaranja taloga i obojenih produkata.

EKSPERIMENTALNI DIO

Ispitivani biljni materijal

Ispitani su na zraku osušeni listovi eksperimentalno uzgojenih uzoraka sljedećih vrsta roda *Thalictrum* L.: *T. flavum* L., *T. foetidum* L., *T. lucidum* L. i *T. simplex* L. (uključujući i niže svojte: subsp. *boreale* (F. Nyl.) A. & D. Löve, subsp. *gallicum* (Rouy & Fouc.) Tutin. Biljke su uzgojene u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Inozemni uzorci sjemena dobiveni su razmjenom između navedenog botaničkog vrta i botaničkih vrtova u Finskoj, Francuskoj, Italiji, Njemačkoj i Švedskoj.

Biljni materijal sabran je u rujnu 1998. i identificiran u Zavodu za botaniku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Ispitivani uzorci označeni su prema podrijetlu sjemena: fl(HR), fl(D) – hrvatski i njemački uzorak vrste *T. flavum*; fo(I), fo(D1), fo(D2) – talijanski i njemački uzorci vrste *T. foetidum*; lu(HR), lu(D) – hrvatski i njemački uzorak vrste *T. lucidum*; s(S), sb(SF), sg(F), – švedski, finski i francuski uzorak vrste *T. simplex* i pripadajućih nižih svojti (subsp. *boreale*, subsp. *gallicum*).

Metode i postupci ispitivanja

1. Dokazivanje alkaloida taložnim reakcijama

Prisutnost alkaloida u listovima ispitivanih biljnih primjeraka dokazana je reakcijama s Mayerovim reagensom [kalij-živa(II)-jodid] i 10%-tnom tanskom kiselinom (25).

2. Ispitivanje saponina tankoslojnom kromatografijom

Odjeljivanje saponinskih supstancija iz metanolnih ekstrakata listova ispitivanih biljnih primjeraka provedeno je na tankom sloju Kieselgela 60 F₂₅₄ pomoću pokretne faze kloroform-metanol-voda u volumnim omjerima 64:50:10 (26a). Detekcija je provedena prskanjem kromatograma reagensom i zagrijavanjem na 105 °C. Reagens je pripremljen miješanjem 5 mL klorsulfonske kiseline s 10 mL ledene octene kiseline uz oprezno hlađenje (27).

3. Ispitivanje sterola i triterpena tankoslojnom kromatografijom

Dokazivanje i karakterizacija sterola i triterpena u metanolnim ekstraktima ispitivanih biljnih uzoraka provedena je tankoslojnom kromatografijom uz primjenu pokretne faze benzen-aceton 9:1 V/V i klorsulfonske kiseline kao reagensa za detekciju (28).

4. Dokazivanje trjeslovina reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga

Prisutnost trjeslovina u listovima ispitivanih biljnih vrsta dokazana je općim reakcijama sa sljedećim reagensima: 5%-tnom otopinom željezo(III)-klorida, 1%-tnom otopinom željezo(III)-amonij-sulfata, 10%-tnom otopinom olovo-acetata i 1%-tnom otopinom želatine. Navedene reakcije te različite reakcije za dokazivanje kondenziranih trjeslovina i trjeslovina koje hidroliziraju provedene su prema postupku opisanom u prethodnom radu (27).

5. Ispitivanje flavonoida tankoslojnom kromatografijom

Odjeljivanje flavonoida i srodnih spojeva iz metanolnih ekstrakata listova provedeno je na tankom sloju Kieselgela 60 F₂₅₄ pomoću pokretne faze etilacetat-mravlja kiselina-konc. octena kiselina-voda 100:11:11:27 V/V (26b). Detekcija je provedena prskanjem kromatograma modificiranim Naturstoff-reagensom (NST/PEG) i promatranjem pod UV-svjetlom pri 365 nm (27).



Thalictrum flavum L.*

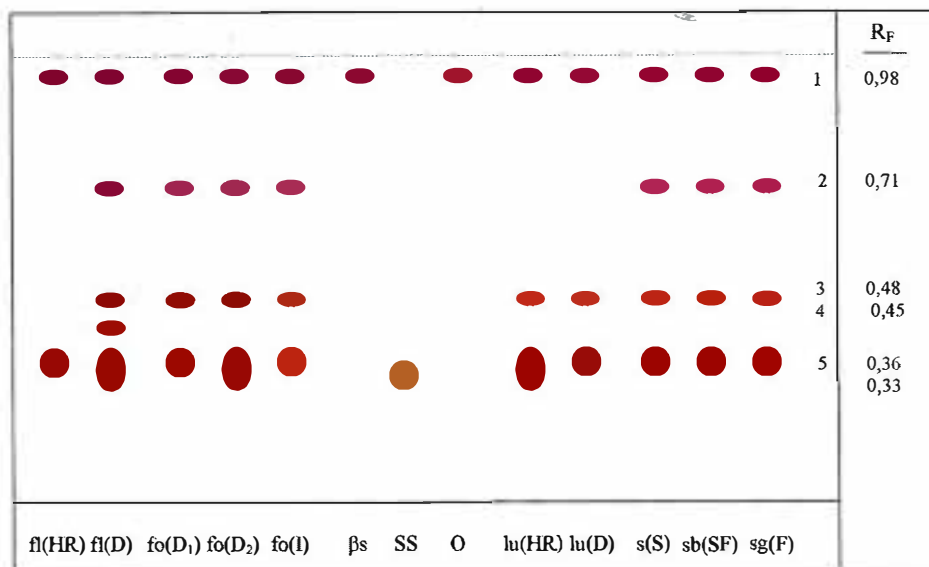
REZULTATI I RASPRAVA

1. Alkaloidi

U svim ispitanim uzorcima vrsta roda *Thalictrum* dokazana je prisutnost alkaloida. U reakcijama s Mayerovim reagensom nastali su svijetlosmeđi do smeđi talozi, a u reakcijama s taninskom kiselinom svijetlosmeđa zamućenja i talozi.

2. Saponini

Prisutnost saponina u listovima ispitivanih biljnih vrsta dokazana je metodom tankoslojne kromatografije. Na kromatogramu je uočeno pet odijeljenih supstancija koje su se s klorsulfonskom kiselinom obojile smeđe i ljubičasto (Slika 1.). U svim uzorcima isticala se smeđa saponinska zona 5 ($R_F =$



Slika 1. Kromatogram saponina iz listova vrsta: *Thalictrum flavum* L., *T. foetidum* L., *T. lucidum* L. i *T. simplex* L.

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄

Pokretna faza: kloroform-metanol-voda 64:50:10 V/V

Detekcija: klorsulfonska kiselina, 105 °C

Metanolni ekstrakti listova ispitivanih vrsta

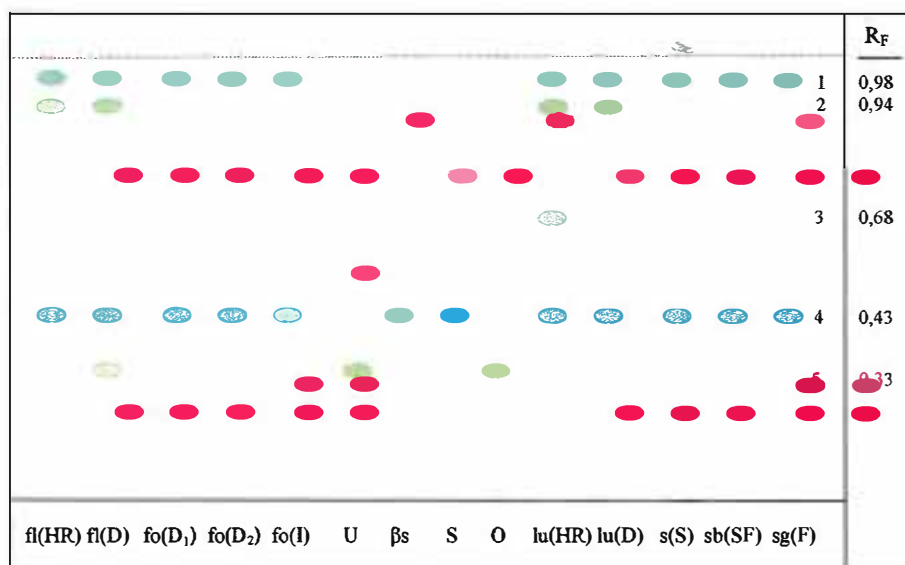
različitog europskog podrijetla: fl(HR), fl(D) – *T. flavum* (Hrvatska, Njemačka); fo(D₁), fo(D₂), fo(I) – *T. foetidum* (Njemačka, Italija); lu(HR), lu(D) – *T. lucidum* (Hrvatska, Njemačka); s(S) – *T. simplex* (Švedska); sb(SF) – *T. simplex subsp. boreale* (Finska); sg(F) – *T. simplex subsp. gallicum* (Francuska)

Poredbene supstancije: βs – β-sitosterol, SS – saponinski standard, O – oleanolna kiselina

0,36) te ljubičasta zona 1 ($R_F = 0,98$) koja je odgovarala poredbenoj sterolnoj i triterpenskoj supstanciji. Izuzev hrvatskog primjerka vrste *T. flavum*, saponinski spoj označen brojem 3 ($R_F = 0,48$) također je bio prisutan u svim biljnim uzorcima, dok ljubičasta zona 2 ($R_F = 0,71$) nije detektirana jedino u vrsti *T. lucidum*. Rezultati su pokazali da se, osim hrvatskog i njemačkog uzorka vrste *T. flavum*, primjerci koji pripadaju istoj biljnoj vrsti međusobno ne razlikuju, te da ispitane vrste roda *Thalictrum* imaju vrlo sličan sastav saponinskih spojeva.

3. Steroli i triterpenske kiseline

Na Slici 2. prikazani su rezultati ispitivanja sterola i triterpena u metanolnim ekstraktima listova vrsta roda *Thalictrum* tankoslojnom kromatog-



Slika 2. Kromatogram sterola i triterpena iz listova vrsta: *Thalictrum flavum* L., *T. foetidum* L., *T. lucidum* L. i *T. simplex* L.

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄

Pokretna faza: benzen-aceton 9:1 V/V

Detekcija: klorsulfonska kiselina, 105C

Metanolni ekstrakti listova ispitivanih vrsta

različitog europskog podrijetla: fl(HR), fl(D) – *T. flavum* (Hrvatska,

Njemačka); fo(D₁), fo(D₂), fo(I) – *T. foetidum* (Njemačka, Italija);

lu(HR), lu(D) – *T. lucidum* (Hrvatska, Njemačka); s(S) – *T. simplex*

(Švedska); sb(SF) – *T. simplex* subsp. boreale (Finska); sg(F) – *T. simplex* subsp. gallicum (Francuska)

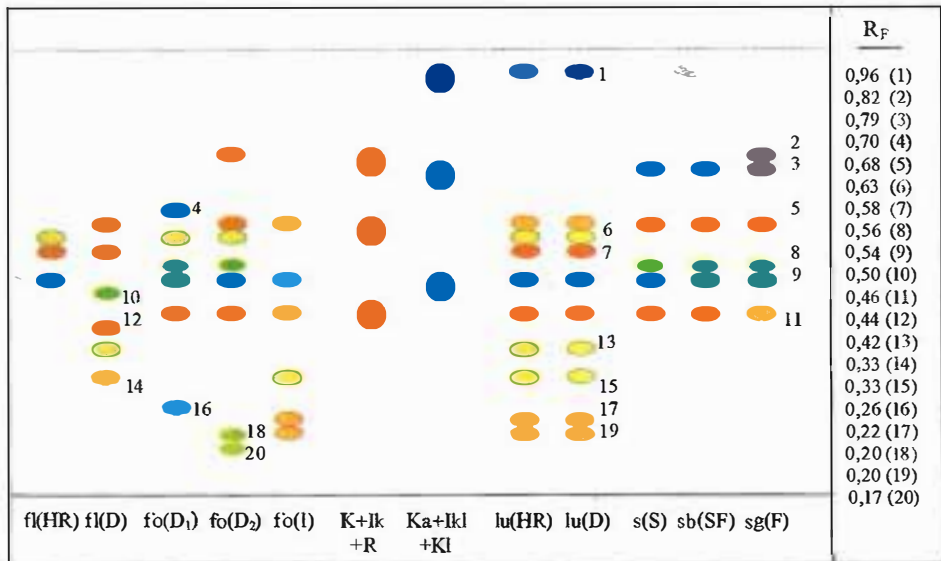
Poredbene supstancije: U – ursolna kiselina, βs – β-sitosterol,

S – stigmasterol, O – oleanolna kiselina

rafijom. U svim ispitanim uzorcima dokazana je prisutnost sterolne supstance označene brojem 4 ($R_F = 0,43$), koja je kromatografski odgovarala β -sitosterolu i stigmasterolu. Međutim, triterpenska kiselina (oleanolna i/ili ursolna kiselina) detektirana je samo u njemačkom uzorku vrste *T. flavum* (zona 5, $R_F = 0,33$).

4. Trjeslovine

Općim reakcijama s metalnim solima i želatinom dokazana je prisutnost trjeslovina u svim biljnim uzorcima. Dodatkom željezo(III)-klorida nastalo je plavozelena zamućenje. Tamnoplavo zamućenje dobiveno je u reakciji sa željezo(III)-amonij-sulfatom, a putenasti talog u reakciji s olovo-acetatom.



Slika 3. Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina iz listova vrsta: *Thalictrum flavum* L., *T. foetidum* L., *T. lucidum* L. i *T. simplex* L.

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F₂₅₄

Pokretna faza: etilacetat-mravlja kiselina-konc.

octena kiselina-voda 100:11:11:27 V/V

Detekcija: NST/PEG (UV-356 nm)

Metanolni ekstrakti listova ispitivanih vrsta različitog europskog podrijetla: fl(HR), fl(D) – *T. flavum* (Hrvatska,

Njemačka); fo(D₁), fo(D₂), fo(I) – *T. foetidum* (Njemačka, Italija);

lu(HR), lu(D) – *T. lucidum* (Hrvatska, Njemačka); s(S) – *T. simplex*

(Švedska); sb(SF) – *T. simplex subsp. boreale* (Finska); sg(F) – *T. simplex subsp. gallicum* (Francuska)

Poredbene supstancije: K – kvercitrin, Ik – izokvercitrin, R – rutin,

Ka – kavena kiselina, IkI – izoklorogenska kiselina, Kl – klorogenska kiselina

Nisu nastali talozi u reakciji s formaldehidom i kloridnom kiselinom, dok se u svakom uzorku pojavio ljubičastoplavi prsten nakon dodatka natrij-acetata i željezo(III)-amonij-sulfata. Time je dokazano da listovi ispitivanih vrsta sadrže trjeslovine koje hidroliziraju, a ne sadrže kondenzirane trjeslovine.

5. Flavonoidi i fenolne kiseline

Kvalitativna analiza flavonoida i srodnih spojeva u listovima ispitivanih vrsta roda *Thalictrum* provedena je tankoslojnom kromatografijom. Na tankom sloju adsorbensa odijeljeno je 20 zona koje su pri UV-365 nm, nakon prskanja NST/PEG-reagensom, fluorescirale narančasto, žuto, zeleno i plavo (Slika 3.). Flavonoidi i fenolne kiseline detektirani su u metanolnim ekstraktima svih biljnih uzoraka. Iako su zabilježene znatne međusobne razlike, sve su vrste sadržavale izokvercitrin (narančasta zona 5, $R_F = 0,68$) i klorogensku kiselinu (svijetloplava zona 9, $R_F = 0,54$), a rutin (narančasta zona 11, $R_F = 0,46$) nije detektiran jedino u uzorcima vrste *T. flavum*. Kvercitrin je bio prisutan u vrstama *T. foetidum* i *T. simplex* (narančasta zona 2, $R_F = 0,82$). Kavena kiselina (plava zona 1, $R_F = 0,98$) dokazana je u vrsti *T. lucidum*, dok je izoklorogenska kiselina pronađena jedino u uzorcima vrste *T. simplex* (svijetloplava zona 3, $R_F = 0,79$). Rezultati su također pokazali da se primjerci iste biljne vrste međusobno razlikuju. Varijabilnost u sastavu flavonoida i fenolnih kiselina bila je posebno izražena u vrstama *T. flavum* i *T. foetidum*, a nije zabilježena u vrsti *T. lucidum*.

ZAKLJUČAK

Usporednom fitokemijskom istraživanju podvrgnuti su eksperimentalno uzgojeni uzorci vrsta roda *Thalictrum* L. (*T. flavum* L., *T. foetidum* L., *T. lucidum* L., *T. simplex* L.) finskog, francuskog, hrvatskog, njemačkog, švedskog i talijanskog podrijetla. Alkaloidi, saponini, steroli, triterpeni, trjeslovine koje hidroliziraju, flavonoidi i fenolne kiseline dokazani su u listovima navedenih vrsta metodom tankoslojne kromatografije te reakcijama stvaranja taloga i obojenih produkata. Utvrđena je prisutnost β -sitosterola i/ili stigmasterola u svim ispitanim uzorcima, dok su samo u vrsti *T. flavum* detektirane oleanolna i/ili ursolna kiselina. U metanolnim ekstraktima listova ispitanih biljnih vrsta dokazana je prisutnost rutina, izokvercitrina i kvercitrina, te klorogenske, izoklorogenske i kavene kiseline. Utvrđena je značajna razlika u sastavu flavonoida i fenolnih kiselina među primjercima iste vrste kao i između pojedinih biljnih vrsta. Stoga bi, s kemotaksonomskog gledišta, dobiveni rezultati mogli pridonijeti rješavanju srodstvenih odnosa unutar roda *Thalictrum*.

Literatura - References

1. P. L. Schiff, R. W. Doskotch, *Lloydia* 33 (1970) 403.
2. G. Guangyao, C. Sibao, Y. Junshan, X. Peigen, *Fitoterapia* 71 (2000) 627.
3. R. Hegnauer, *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Band 6, Birkhäuser Verlag, Basel-Stuttgart 1973, 13.

4. W. N. Wu, J. L. Beal, L. A. Mitscher, K. N. Salman, P. Patil, *Lloydia* **39** (1976) 204.
5. S. Mukhamedova, C. K. Maekh, S. Y. Yunusov, *Chem. Nat. Comp.* **19** (1983) 376.
6. L. G. Kintsurashvili, V. Y. Yachnadze, *Chem. Nat. Comp.* **19** (1983) 629.
7. D. A. Muraveva, O. N. Tolkachev, A. A. Akopov, *Chem. Nat. Comp.* **21** (1985) 393.
8. Y. Ally, A. Galal, L. K. Wong, E. W. Fu, F. T. Lin, F. K. Duah, P. L. Schiff, *Phytochemistry* **28** (1989) 1967.
9. K. H. C. Baser, A. Ertan, *Planta Med.* **56** (1990) 337.
10. M. Velcheva, H. Dutschewska, G. Samuelsson, *Acta Pharm. Nord.* **4** (1992) 57.
11. M. P. Velcheva, H. B. Dutschewska, S. Danghaaghiin, Z. Samdanghiin, Z. Yansanghiin, *Planta Med.* **59** (1993) 262.
12. M. P. Velcheva, R. R. Petrova, Z. Samdanghiin, S. Danghaaghiin, Z. Yansanghiin, *Planta Med.* **60** (1994) 485.
13. M. P. Velcheva, S. Danghaaghiin, Z. Samdanghiin, Z. Yansanghiin, *Phytochemistry* **39** (1995) 683.
14. M. P. Velcheva, C. Werner, M. Hesse, *J. Chromatog.* **730** (1996) 63.
15. M. P. Velcheva, R. R. Petrova, Z. Samdanghiin, S. Danghaaghiin, Z. Yansanghiin, H. Budzikiewicz, M. Hesse, *Phytochemistry* **42** (1996) 535.
16. V. Pabuccuoglu, M. Hesse, *Heterocycles* **45** (1997) 1751.
17. T. L. Varadinova, S. A. Shishkov, N. D. Ivanovska, M. P. Velcheva, S. Danghaaghiin, Z. Samdanghiin, Z. Yansanghiin, *Phytoth. Res.* **10** (1996) 414.
18. T. V. Ganenko, M. I. Isaev, T. T. Gorovits, A. S. Gromova, V. I. Lutskii, A. A. Semenov, N. K. Abubakirov, *Chem. Nat. Comp.* **20** (1984) 433.
19. T. V. Ganenko, M. I. Isaev, M. B. Gorovits, N. D. Abdullaev, V. I. Lutskii, A. A. Semenov, N. K. Abubakirov, *Chem. Nat. Comp.* **21** (1985) 345.
20. T. V. Ganenko, M. I. Isaev, V. I. Lutskii, A. A. Semenov, N. D. Abdullaev, M. B. Gorovits, N. K. Abubakirov, *Chem. Nat. Comp.* **22** (1986) 61.
21. T. V. Ganenko, M. I. Isaev, A. S. Gromova, N. D. Abdullaev, V. I. Lutskii, M. F. Larin, A. A. Semenov, M. B. Gorovits, N. K. Abubakirov, *Chem. Nat. Comp.* **22** (1986) 288.
22. T. V. Ganenko, M. I. Isaev, A. S. Gromova, N. D. Abdullaev, A. A. Semenov, M. B. Gorovits, N. K. Abubakirov, *Chem. Nat. Comp.* **22** (1986) 315.
23. H. Wagner, M. A. Iyengar, J. L. Beal, *Phytochemistry* **10** (1971) 2553.
24. J. F. Mallet, C. Cerrati, E. Ucciani, J. Gamisans, M. Gruber, *Food Chem.* **49** (1994) 61.
25. J. Petričić, Vježbe iz Farmakognozije (Farmaceutske biologije) I, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 1980, 49.
26. H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski, *Drogenanalyse*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1983, a)225, b)163.
27. S. Vladimir-Knežević, T. Nikolić, *Farm. Glas.* **57** (2001) 307.
28. S. Vladimir, Izolacija i karakterizacija biološki aktivnih spojeva timijanolinog vrisića - *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 1993, 42.

*Izvor fotografije:

O. Sebald, S. Seybold, G. Philippi, *Die Farn- und Blütenpflanzen Baden-Wuerttenbergs, Band 1, Spezieller Teil (Pteridophyta, Spermatophyta) Lycopodiaceae bis Plumbaginaceae, Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co. Stuttgart 1993.*

Primljeno 16. X. 2001.