

Kvantitativna analiza polifenola u nekim vrstama roda *Teucrium* L.

ŽELJAN MALEŠ¹, MARIJA BABAC¹, KROATA HAZLER PILEPIĆ¹, MARIJANA ZOVKO²

¹Zavod za farmaceutsku botaniku i

²Zavod za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Quantitative analysis of the polyphenols in some species of the genus *Teucrium* L.

S u m m a r y – The research was conducted on the leaves and stems of the following species of the genus *Teucrium*: *T. scordioides*, *T. fruticans* and *T. polium*. Species of the genus *Teucrium* are widespread throughout the Mediterranean region and are used in folk medicine as antidiabetics, diuretics, diaphoretics, expectorants, cholagogues, spasmolytics and antiinflammatory drugs.

The quantity of polyphenols was determined using spectrophotometric methods. The results were compared between different species, plant parts and, for *T. polium*, different collection sites. *T. fruticans* contained the highest quantity of flavonoids, 0.437% (0.347% in the leaves and 0.090% in the stems) and the lowest quantity of phenolic acids, 4.05% (2.67% in the leaves and 1.38% in the stems). *T. polium* (Korčula) contained the highest quantity of phenolic acids, 5.72% (3.67% in the leaves and 2.05% in the stems) and the lowest quantity of flavonoids, 0.150% (0.125% in the leaves and 0.025% in the stems). The content of flavonoids and phenolic acids was higher in the leaves than in the stems. *T. scordioides* contained the highest quantity of total polyphenols, 15.63% while *T. polium* (Lastovo) contained the lowest quantity, 10.71%. The quantity of tannins ranged from 1.00 to 4.02%. *T. polium* collected on Korčula contained higher quantity of phenolic acids, total polyphenols, polyphenols unadsorbed on hide powder and lower quantity of flavonoids and tannins than the same species collected on Lastovo.

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

UVOD

U suvremenom svijetu znanosti i tehnologije, da bi očuvao svoje zdravlje, čovjek se vraća prirodnim izvorima. Današnji trend vraćanja upotrebe ljekovitog bilja razlog je brojnih znanstvenih ispitivanja nedovoljno istraženih vrsta.

Hrvatska flora obiluje brojnim i raznolikim vrstama, od kojih su mnoge nedovoljno kemijski i farmakološki istražene. Takav je i rod *Teucrium* L. (dubačac), iz porodice *Lamiaceae*. Vrste ovog roda zastupljene su uglavnom u flori mediteranskog područja. U Hrvatskoj su rasprostranjene sljedeće vrste roda *Teucrium*: *T. arduini* L. (endem Dinarida), *T. botrys* L., *T. chamaedrys* L., *T. flavum* L., *T. fruticans* L., *T. montanum* L., *T. polium* L. i *T. scordioides* Schreb.

Svrha ovog rada bila je određivanje količine polifenola u listovima i stabljikama triju vrsta roda *Teucrium*: *T. scordioides*, *T. fruticans* i *T. polium*

BOTANIČKI PODACI

U okviru botaničkih podataka prikazana su morfološka obilježja roda *Teucrium* L. te morfološka obilježja i rasprostranjenost vrsta *T. scordioides* Schreb., *T. fruticans* L. i *T. polium* L.

1. Morfološka obilježja roda *Teucrium* L.

Vrste roda *Teucrium* L. su trajne zeljaste biljke ili polugrmovi, često aromatične.

Listovi su cjelovitog ruba, narovašeni ili perasti, najčešće na kratkoj peteljci.

Cvjetovi su po 1 do 3 smješteni u prividnim pršljenima, u pazušcima listova ili su skupljeni u vršne grozdaste ili klasaste cvatove. Čaška je cjevasta ili zvonasta, nazubljena ili dvousnata. Vjenčić ima cijev koja je uklopljena u čašku. Gornja je usna mala ili je prividno nema jer je rascijepljena, a njezine polovice priklonjene su donjoj usni. Donja je usna peterodijelna, s velikim srednjim režnjem, koji je cjelovitog ruba ili nazubljen. Četiri prašnika strše kroz pukotinu gornje usne.

Plod je jajasti oraščić (1).

2. Morfološka obilježja i rasprostranjenost vrsta *T. scordioides* Schreb., *T. fruticans* L. i *T. polium* L.

Teucrium scordioides Schreb. – močvarni dubačac, zeljasta je trajnica, visoka 10–25 cm (slika 1.).

Listovi su sjedeći, bez peteljke, najviše dvostruko dulji nego širi, tanki, srolike osnovice i dlanaste nervature. S obje strane su dlakavi, na rubu narovašeni ili cjelovitog ruba. Listovi i stabljika su često presvučeni ljubičasto.

Cvjetovi su veličine 8–10 mm, sjedeći ili na kratkim stapkama, po 1–4 u cimoznim cvatovima. Vjenčić je tamnocrven, rjeđe bijeli.

Stabljika je jednostavna ili razgranjena, obrasla bijelim dlakama. Razvija vriježe koje obično nemaju listove, a služe za razmnožavanje.

Plod je oraščić, grube površine, dug do 1 mm (2, 3).

Vrsta *T. scordioides* raste na muljevitom tlu močvarnih, jezernih i riječnih područja. Rasprostranjena je na obali Sredozemnog mora te Atlanskog oceana (4).



Slika 1. *Teucrium scordioides* Schreb.

T. fruticans L. – grmoliki dubačac, do 1,5 m visok je polugrm sa četvrtastim stabljikama (slika 2.).

Listovi su ovalni ili kopljasti, na kratkoj peteljci, dugi do 4 cm. Naličje lista je bijelo, a lice zagasito zeleno.

Čaška ima pet podjednakih zubaca. Cvjetovi su pojedinačni u pazušcima listova na dugim stapkama. Vjenčić je blijedo modar.

Vrsta *T. fruticans* rasprostranjena je u mediteranskom području, od Ligurije do Španjolske i Alžira (2, 5).



Slika 2. *Teucrium fruticans* L.

Teucrium polium L. – pustenasti dubačac, razgranjeni je polugrm, visok do 30 cm (slika 3.).

Listovi su uski, duguljasti, kijačasto produljeni, na površini pustenasti, izverugani, na rubu previnuti.

Cvjetovi su sjedeći ili na vrlo kratkim stapkama, u prividnim pršljenima koji su skupljeni u okruglaste ili ovalne terminalne glavice. Čaška je zvonasta, izvana pustenasta, s pet podjednakih zubaca. Vjenčić je bijel, ponekad žućkast ili crvenoljubičast. Cvate u srpnju i kolovozu.

Stabljika je okrugla, dlakava ili pustenasta (2, 3).

Vrsta *T. polium* rasprostranjena je u užem Sredozemlju, posebice u vazdazelenom području. Izrazito je kserotermofilna vrsta. Na Biokovu raste do najviših vrhova (6).



Slika 3. *Teucrium polium* L.

KEMIJSKI PODACI

Provedena su brojna istraživanja u dokazivanju i određivanju djelatnih sastavnica vrsta roda *Teucrium*.

Vrste roda *Teucrium* ubrajaju se među aromatične biljne vrste koje sadrže eterično ulje. Sadržaj eteričnog ulja varira od 0,07 do 1,30% (6). Iz eteričnog ulja vrste *T. fruticans* izolirani su β -pinen, β -mircen, germakren D i β -kariofilen (7). U eteričnom ulju vrste *T. polium* utvrđena je nazočnost deset terpenoidnih sastavnica, uključujući ugljikovodike α -felandren, β -pinen, γ i δ -kardinene, limonen te alkohole linalol, terpin-4-ol, cedrol, cedrenol i guaial.

Kemijskim istraživanjem vrsta roda *Teucrium* dokazana je prisutnost trjeslovina, diterpena (gorkih tvari), sterola, saponina, šećera i flavonoida (8).

DJELOVANJE I UPORABA

Vrste roda *Teucrium* imaju stoljetnu primjenu u narodnoj medicini kao antidijabetici, diuretici, dijaforetici, ekspektoransi, kolagoga, protuupalne tvari, spazmolitici te stoma-hici.

Najveći broj znanstvenih istraživanja o djelovanju vrsta roda *Teucrium* odnosi se na vrstu *T. polium*. Vodeni ekstrakt ove vrste pokazao je povoljan učinak na čir želuca. Potvrđeno je izlječenje čira kod 50% štakora nakon i.p. i kod 85% štakora nakon p.o. primjene ekstrakta.

Dekokt nadzemnih djelova vrste *T. polium* pokazao je smanjenje razine šećera u krvi, povezano s povećanjem perifernog metabolizma glukoze, što opravdava upotrebu ove biljke kao antidijabetika u pučkoj medicini. Osim hipoglikemijskog, spazmolitičkog i protuupalnog djelovanja, dekokt je pokazao anoreksični učinak.

Vrsta *T. polium* može se primjenjivati pri snižavanju povišene tjelesne temperature, povišenog krvnog tlaka te kod liječenja bakterijskih infekcija (8).

Najnovija *in vivo* istraživanja otkrila su antioksidativni učinak vrste *T. polium* (9).

EKSPERIMENTALNI DIO

Materijal za istraživanje

Materijal za istraživanje sastojao se od usitnjenih listova i stabljika triju vrsta roda *Teucrium* skupljenih na različitim nalazištima u Hrvatskoj: *T. scordioides* – 05.08.2004., Krk, *T. fruticans* – 23.08.2004., Dubrovnik, *T. polium* – 24.07.2007., Korčula i *T. polium* – 29.07.2007., Lastovo.

1. Identifikacija biljnog materijala

Identitet istraženih biljnih vrsta izvršen je u Zavodu za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i potvrđen je ispitivanjem vanjske i unutarnje građe skupljenih uzoraka (2).

2. Određivanje količine flavonoida

Kvantitativna analiza flavonoida provedena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (10), koja se temelji na određivanju ukupnih flavonoidnih aglikona nakon stvaranja kompleksa s Al^{3+} 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.

3. Određivanje količine fenolnih kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina provedena je spektrofotometrijskom metodom prema postupku iz Europske farmakopeje (11), koja se temelji na mjerenju apsorbancije kompleksa nastalog u reakciji između fenolnih kiselina i otopine natrijevog nitrita

s natrijevim molibdatom. Količina fenolnih kiselina u svim uzorcima određena je tri puta, a iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije (12).

4. Određivanje količine ukupnih polifenola, polifenola neadsorbiranih na kožni prašak i trjeslovina

Kvantitativna analiza provedena je kombinacijom kolorimetrijske metode i metode kožnog praška (13). Količina ukupnih polifenola u ekstraktu biljnog materijala određena je na temelju plavo obojene reakcije s volfram-fosforom kiselinom. Trjeslovine su uklonjene iz ekstrakta vezivanjem na kožni prašak, a u filtratu su zaostali netaninski polifenoli koji su određeni na isti način kao i ukupni polifenoli. Količina ukupnih polifenola, polifenola neadsorbiranih na kožni prašak i trjeslovina u svim uzorcima određena je tri puta, a iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

REZULTATI I RASPRAVA

Radi lakšeg prikaza rezultata, uzorci biljnog materijala označeni su arapskim brojevima kako je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Uzorci biljnog materijala korišteni u ovom istraživanju

Uzorak	Vrsta	Biljni organ	Mjesto skupljanja
1	<i>T. scordioides</i>	list	Krk
2		stabljika	
3	<i>T. fruticans</i>	list	Dubrovnik
4		stabljika	
5	<i>T. polium</i>	list	Korčula
6		stabljika	
7	<i>T. polium</i>	list	Lastovo
8		stabljika	

1. Kvantitativna analiza flavonoida

Rezultati kvantitativne analize flavonoida prikazani su u tablici 2. Istraživani uzorci listova i stabljika vrsta roda *Teucrium* sadržavali su 0,023–0,347% flavonoida. Najveću količinu flavonoida sadržavala je vrsta *T. fruticans*, 0,347% u listovima, te 0,090% u stabljikama, a najmanju vrsta *T. polium* (Korčula), 0,125% u listovima, te 0,025% u stabljikama.

U svim vrstama količina flavonoida bila je veća u listovima nego u stabljikama. Količina flavonoida u listovima kretala se od 0,125% do 0,347%, a u stabljikama od 0,023% do 0,090%

Listovi i stabljike vrste *T. polium* sa Lastova sadržavali su za 0,028% veću količinu flavonoida nego ista vrsta sa Korčule (0,178% Lastovo; 0,150% Korčula).

Tablica 2. Količina (%)^a flavonoida u ispitivanim uzorcima

Uzorak	Flavonoidi
1	0,129 ± 0,007
2	0,023 ± 0,002
3	0,347 ± 0,004
4	0,090 ± 0,007
5	0,125 ± 0,007
6	0,025 ± 0,002
7	0,146 ± 0,001
8	0,032 ± 0,000

a = $\bar{x} \pm SD$ (n = 3)

2. Kvantitativna analiza fenolnih kiselina

Rezultati kvantitativne analize fenolnih kiselina prikazani su u tablici 3. Istraživani uzorci listova i stabljika vrsta roda *Teucrium* sadržavali su 1,38 – 3,67% fenolnih kiselina. Najveću količinu fenolnih kiselina sadržavala je vrsta *T. polium* (Korčula), 3,67% u listovima, te 2,05% u stabljikama, a najmanju vrsta *T. fruticans*, 2,67% u listovima, te 1,38% u stabljikama.

U svim vrstama količina fenolnih kiselina bila je veća u listovima nego u stabljikama. Količina fenolnih kiselina u listovima kretala se od 2,67% do 3,67%, a u stabljikama od 1,38% do 2,05%.

Listovi i stabljike vrste *T. polium* sa Korčule sadržavali su za 1,37% veću količinu fenolnih kiselina nego ista vrsta sa Lastova (5,72% Korčula; 4,35% Lastovo).

Tablica 3. Količina (%)^a fenolnih kiselina u ispitivanim uzorcima

Uzorak	Fenolne kiseline
1	3,28 ± 0,17
2	1,99 ± 0,04
3	2,67 ± 0,00
4	1,38 ± 0,15
5	3,67 ± 0,09
6	2,05 ± 0,01
7	2,90 ± 0,08
8	1,45 ± 0,05

a = $\bar{x} \pm SD$ (n = 3)

3. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola, polifenola neadsorbiranih na kožni prašak i trjeslovina

Rezultati kvantitativne analize ukupnih polifenola, polifenola neadsorbiranih na kožni prašak (netaninskih polifenola) i trjeslovina prikazani su u tablici 4. Istraživani uzorci listova i stabljika vrsta roda *Teucrium* sadržavali su 4,59 – 11,04% ukupnih polifenola. Najveću količinu ukupnih polifenola sadržavala je vrsta *T. scordioides*, 11,04% u listovima, te 4,59% u stabljikama, a najmanju vrsta *T. polium* (Lastovo), 4,76% u listovima, te 5,95% u stabljikama.

Vrste *T. scordioides* i *T. polium* (Korčula) sadržavale su najveću količinu netaninskih polifenola (oko 10%). Vrsta *T. scordioides* sadržavala je dva puta veću količinu u listovima nego u stabljikama. Vrsta *T. polium* (Korčula) također je sadržavala veću količinu u listovima, ali ta je razlika bila znatno manja, 5,51% u listovima, te 4,59% u stabljikama. Najmanju količinu netaninskih polifenola sadržavala je vrsta *T. polium* (Lastovo), 1,39% u listovima, te 1,94% u stabljikama.

Istraživani uzorci sadržavali su 1,00 – 4,02% trjeslovina. Najveću količinu trjeslovina sadržavala je vrsta *T. polium* (Lastovo), 3,37% u listovima, te 4,01% u stabljikama, a najmanju vrsta *T. polium* (Korčula), 1,07% u listovima te 1,30% u stabljikama. Vrste *T. scordioides* i *T. fruticans* sadržavale su veću količinu trjeslovina u listovima, dok je vrsta *T. polium* (Korčula i Lastovo) sadržavala veću količinu u stabljikama.

Tablica 4. Količina (%)a ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina u ispitivanim uzorcima

Uzorak	Ukupni polifenoli	Netaninski polifenoli	Trjeslovine
1	11,04 ± 0,09	7,02 ± 0,29	4,02 ± 0,19
2	4,59 ± 0,15	3,59 ± 0,07	1,00 ± 0,08
3	7,79 ± 0,14	5,24 ± 0,21	2,55 ± 0,07
4	4,62 ± 0,28	3,12 ± 0,17	1,50 ± 0,11
5	6,58 ± 0,29	5,51 ± 0,21	1,07 ± 0,04
6	5,89 ± 0,12	4,59 ± 0,09	1,30 ± 0,03
7	4,76 ± 0,19	1,39 ± 0,09	3,37 ± 0,01
8	5,95 ± 0,21	1,94 ± 0,12	4,01 ± 0,09

a = $\bar{x} \pm SD$ (n = 3)

ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju određena je količina polifenola u tri različite vrste roda *Teucrium*: *T. scordioides*, *T. fruticans* i *T. polium*. Napravljena je usporedba sadržaja polifenola u vrsti *T. polium* skupljenoj na dva različita područja primorske Hrvatske.

Kvantitativna analiza flavonoida i fenolnih kiselina pokazala je u svim ispitivanim vrstama veći sadržaj u listovima nego u stabljikama.

Najveću količinu flavonoida sadržavala je vrsta *T. fruticans*, a najmanju *T. polium* (Korčula). Najveću količinu fenolnih kiselina sadržavala je vrsta *T. polium* (Korčula), a najmanju vrsta *T. fruticans*.

Rezultati kvantitativne analize ukupnih polifenola pokazali su značajan sadržaj tih tvari u ispitivanim vrstama. Najveću količinu ukupnih polifenola sadržavala je vrsta *T. scordioides*, 15,63%, a najmanju vrsta *T. polium* (Lastovo), 10,71%.

Sadržaj trjeslovina u istraživanim uzorcima listova i stabljika kretao se od 1,00 do 4,02%.

Rezultati kvantitativne analize polifenola u vrsti *T. polium* skupljenoj na dva različita područja, Lastovo i Korčula, pokazali su razliku u sadržaju tih tvari ovisno o nalazištu. Vrsta *T. polium* skupljena na Korčuli sadržavala je više fenolnih kiselina, ukupnih i netanskih polifenola, a manje flavonoida i trjeslovina nego ista vrsta skupljena na Lastovu.

Zahvala. – »Prikazani rezultati proizašli su iz znanstvenog projekta (Farmakobotanička i kemijska karakterizacija cvjetnica hrvatske flore), provođenog uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.«

Literatura – References

1. S. Forenbacher, Velebit i njegov biljni svijet, Školska knjiga, Zagreb 1990, 570.
2. R. Domac, Flora Hrvatske: Priručnik za određivanje bilja (II izdanje), Školska knjiga, Zagreb 2002, 286.
3. T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb Eds., Flora Europaea (Diapensaceae to Myoporaceae), Cambridge University Press, Cambridge 1972, 129.
4. G. Hegi, Illustrierte Flora von Mittel-Europa (Band V, 1. Teil), Carl Hanser Verlag, München 1954, 516.
5. <http://www.funghiitaliani.it/index.php?showtopic=18060>, datum pristupa 15.2.2008.
6. N. Arnold, B. Bellamaria, G. Valentini, S. M. Rafaiiani, J. Ethnopharmacol. 35 (1991) 105.
7. G. Flamini, P. L. Cioni, I. Morelli, S. Maccioni, G. Monti, Flavour Fragr. J. 16 (2001) 367.
8. R. Jurišić, Kemotaksonomska istraživanja vrsta roda *Teucrium*. Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb 1998.
9. P. Hasani, N. Yasa, S. Vosough-Ghanbari, A. Mohammadirad, G. Dehghan, M. Abdollahi, Acta Pharm. 57 (2007) 123.
10. B. Christ, K. H. Müller, Arch. Pharm. 293 (1960) 1033.
11. European Pharmacopoeia, Fifth Edition (Eur. Ph. 5.0), Vol. 2, Council of Europe, Strasbourg Cedex, 2004, 1990.
12. Ž. Maleš, M. Plazibat, I. Gregov, Farm. Glas. 64 (2008) 1.
13. Ž. Maleš, V. Bilušić Vundać, M. Plazibat, D. Lazić, I. Gregov, Farm. Glas. 63 (2007) 155.

Primljeno 5. ožujka 2008.

