

# Istraživanje flavonoida, fenolnih kiselina i aminokiselina gole kilavice - *Herniaria glabra* L.

---

Maleš, Željani; Crkvenčić, Maja; Hazler Pilepić, Kroata; Herenda, Frane

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2013, 69, 673 - 684**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:188666>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



# Istraživanje flavonoida, fenolnih kiselina i aminokiselina gole kilavice – *Herniaria glabra* L.

ŽELJAN MALEŠ<sup>1</sup>, MAJA CRKVENČIĆ<sup>1</sup>, KROATA HAZLER PILEPIĆ<sup>1</sup>, FRANE HERENDA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,  
Zavod za farmaceutsku botaniku, 10 000 Zagreb, Schrottova 39

<sup>2</sup>PharmaS d.o.o., 44 317 Popovača, Industrijska cesta 5

## Investigation of flavonoids, phenolic acids and amino acids of smooth rupturewort – *Herniaria glabra* L.

*A b s t r a c t* – *Herniariae herba* (*Herniaria glabra* L., Illecebraceae) is a herbal drug which is traditionally used as a diuretic. Some of the bioactive substances of the drug were analysed using thin-layer chromatography (TLC) and UV/Vis spectrophotometry. Separation and identification of flavonoids and phenolic acids was done using TLC on silica gel and amino acids were investigated using TLC on cellulose. Three flavonoids (isoquercitrin, luteolin and rutin), two phenolic acids (caffeic and chlorogenic acid) and nine amino acids (alanine, asparaginic acid, glutaminic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and threonine) were detected and identified. UV/Vis spectrophotometry was used for the quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids. The results of the analysis indicated that the examined drug, *Herniariae herba*, contains 0.29 % flavonoids and 0.34 % phenolic acids.

(<sup>1</sup>University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Botany, 10000 Zagreb, Croatia and <sup>2</sup>PharmaS d.o.o., 44 317 Popovača, Croatia)

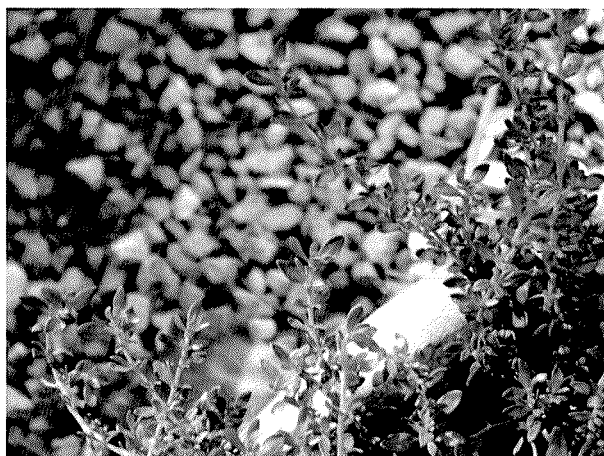
## UVOD

Gola kilavica (*Herniaria glabra* L., Illecebraceae, ranije Caryophyllaceae) (slika 1.) je ljekovita biljna vrsta u narodu poznata i pod nazivima: janjče zelje, jezero zrnatka, sitnica, trava turska, žitnica turska, priputnica, sipanica i trava od kile (1–3). To je zeljasta biljka visine 10 do 30 cm s mnogo po tlu polegnutih i obično razgranjenih stabljika koje su okrugle, nitaste i savitljive, debljine do 2 mm s eliptičnim listićima cjelovitog ruba, dužine do 7 mm (slika 2.).



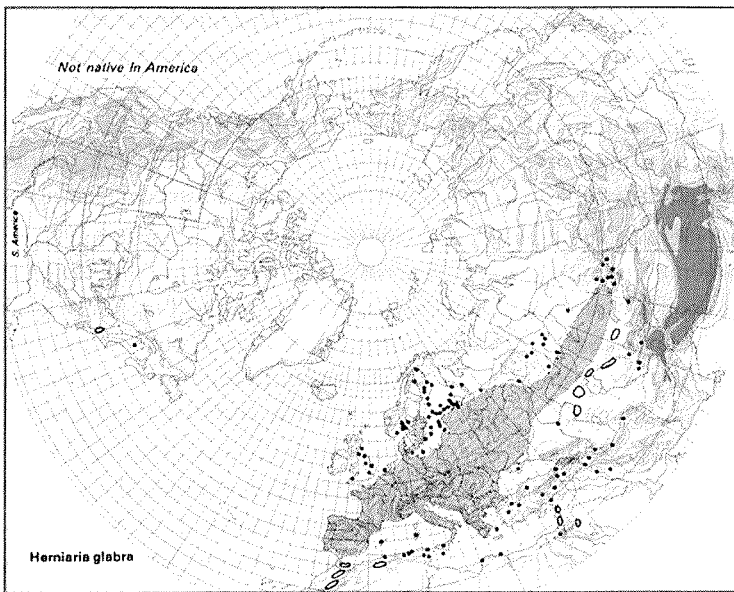
Slika 1. *Herniaria glabra* L. (autorska fotografija, M. Crkvenčić, mag. pharm.)

Donji listići su nasuprotni, a gornji naizmjenični s jajolikim, kožastim, čupavim i bjeličastim palistićima. Cvjetovi su neugledni, dužine do 1 mm, sastavljeni od pet eliptičnih zelenkastožućkastih latica, pet prašnika sa žutim prašnicama i tučka s jed-nopregradnom plodnicom. Biljka cvate od srpnja do studenog (2, 4, 5).



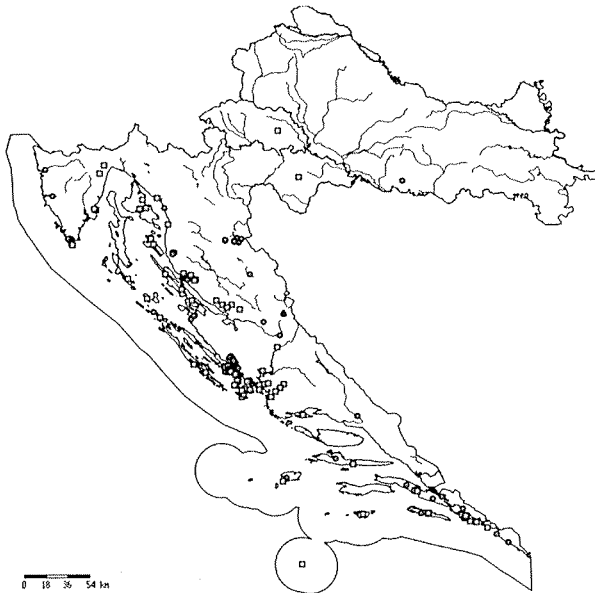
Slika 2. *Herniaria glabra* L. – uvećani prikaz (autorska fotografija, M. Crkvenčić, mag. pharm.)

Gola kilavica je vrsta koja je široko rasprostranjena u Europi i Aziji (slika 3.) (6). U Hrvatskoj se njezina prirodna staništa rasprostiru od obale, pa sve do pretplanin-skih krajeva (slika 4.), a osobito je česta u zapadnoj Hrvatskoj i Dalmaciji (5, 7). Najčešće se može naći na zidovima, kamenjarima, stijenama i kamenjarskim trav-njacima, a u obalnom području i na crljenici (5).



Slika 3. Rasprostranjenost biljne vrste *H. glabra* L. na sjevernoj Zemljinoj polutki (6)

Gola kilavica je od davnina poznata kao sredstvo koje pospješuje izlučivanje mokraćé. U pučkoj medicini upotrebljavala se interno kao lijek kod kile, bubrežnih kamenaca, bolesti bubrega, vodene bolesti, katara dišnih organa, žutice, sifilisa i za



Slika 4. Rasprostranjenost biljne vrste *H. glabra* L. u Hrvatskoj (1)

čišćenje krvi, te izvana za zacjeljivanje rana (7, 8). Njezino diuretičko i antihipertenzivno djelovanje potvrđeno je na eksperimentalnim životinjama, a primijećeno je da ima i hipoglikemijski učinak. Također, pretklinička istraživanja provedena na miševima i štakorima pokazala su nisku akutnu ( $LD_{50} = 8,50$  g/kg u miša) i subkroničnu toksičnost i potvrdila sigurnost njezine uporabe s obzirom na doze koje se tradicionalno primjenjuju, iako pri visokim dozama postoji mogućnost oštećenja jetre i bubrega (8).

Drogu *Herniariae herba* (zelen kilavice) čine osušeni nadzemni dijelovi biljke, sabrani u vrijeme cvatnje. Zelen kilavice nalazi se u sastavu mnogih diuretskih čajeva, a najčešće se kombinira s listom medvjete, čime se postiže pojačan terapijski učinak kod cistitisa i uretritisa (2, 9). Etnobotaničke studije spominju primjenu oparka kilavice u kombinaciji s borovicom, zečjim trnom i pašjom ružom kao diuretika, te primjenu uvarka mješavine sastavljene od kilavice, ljupčaca, lana i medvjete kod upale mokraćnog mjehura (10).

Jako diuretsko djelovanje pripisuje se sadržaju saponina i flavonoida (2). Antihipertenzivni i ekspektorantni učinak također je posljedica djelovanja saponina (3). Poznato je da zelen kilavice sadrži 3 do 9 % saponinske smjese, u kojoj su glavne sastavnice derivati medikagenske kiseline, herniariasaponin I i II. Od ostalih aglikona identificirani su gipsogenska kiselina i 16- $\alpha$ -hidroksimedikagenska kiselina. Droga sadrži i do 2 % flavonolskih heterozida (derivati kvercetina i izoramnetina), te kumarine herniarin i umbeliferon (2, 3, 11).

Novija istraživanja pokazala su da gola kilavica u uvjetima *in vitro* posjeduje baktericidno djelovanje na najčešćeg uzročnika infekcija mokraćnog sustava, uropatogenu *E. coli*. Također, utvrđeno je da ekstrakt kilavice značajno smanjuje stvaranje biofilma, koji se prema nekim istraživačima smatra uzrokom ponavljajućih infekcija. Ovaj inhibitorni učinak pripisuje se sadržaju flavonoidnih aglikona kao što su kvercetin, kempferol, apigenin i naringenin. U vodenom ekstraktu pronađeni su kina kiselina i različiti izomeri njezinih estera s kavenom, ferulinskom i 3-*p*-kumarinskom kiselinom, flavonoli kvercetin, kempferol i izoramnetin, rutin, te iridoidi. Rezultati kvantitativne analize iznosili su 0,69 % za flavonoide (izraženo kao izokvercitrin), 1,02 % za fenolne kiseline (izraženo kao klorogenska kiselina) i 1,18 % za iridoide (izraženo kao loganinska kiselina) (12).

Flavonoidi su polifenolni spojevi koji su u biljnom svijetu vrlo rašireni (13, 14). Služe kao signalne molekule, obrana od patogenih gljivica i mikroorganizama, detoksificirajući agensi, sredstva koja potiču klijanje sjemenaka i spora, zaštita od ultraljubičastog zračenja, alelokemijski agensi, kod prilagodbe na različite okolišne čimbenike kao što su visoke i niske temperature, suša i ekstremne promjene saliniteta, a zbog živih boja privlače oprašivače i životinje koje se hrane plodovima te time potpomažu reprodukciju (15).

Flavonoidi čine približno dvije trećine fenola koji se unose prehranom (16). Ovi spojevi posjeduju niz bioloških djelovanja kao što su učvršćivanje stijenke kapilara i smanjenje njihove propusnosti, vazodilatatorno, antiaterosklerotsko, antitrombotičko,

diuretsko, dijaforetsko, spazmolitičko, protuupalno, antialergijsko, antimikrobno, antivirusno, imunostimulativno, antitumorsko, antioksidativno i estrogeno. Različita biološka djelovanja flavonoida temelje se na njihovoj sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, vezanju teških metala i interakcijama koje imaju s različitim enzimima: inhibiciji fosfolipaze A<sub>2</sub>, ciklooksigenaze, lipooksigenaze, glutation reduktaze, ksantin oksidaze,  $\beta$ -glukuronidaze, hijaluronidaze, alkalne fosfataze, arilsulfataze, H<sup>+</sup>-ATP-aze membrane lizosoma, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATP-aze plazma membrane, fosfodiesteraze, DOPA-dekarboksilaze, katehol-*O*-metiltransferaze, aldoza-reduktaze, kinaze i drugih, tj. indukciji CYP enzima i epoksid hidrolaze (13, 17–19).

Fenolne kiseline također su široko rasprostranjene u biljnom svijetu, a pripisuju im se različite uloge povezane s unosom hranjivih tvari, sintezom proteina, aktivnošću enzima, fotosintezom i alelopatijom.

Fenolne kiseline čine gotovo jednu trećinu ukupnih fenola koji se nose prehranom, a u posljednje vrijeme velika se pažnja posvećuje njihovom antioksidativnom djelovanju (16). Fenolne kiseline kao što su ferulinska i ružmarinska smanjuju aktivnost lipooksigenaze i sprječavaju lančane reakcije slobodnih radikala koji nastaju u organizmu (20). Slično djelovanje ima i kavena kiselina za koju su istraživanja pokazala da bi mogla posjedovati i antitumorsku aktivnost na rak debelog crijeva. Utvrđeno je da mnoge fenolne kiseline (uključujući kavenu kiselinu) inhibiraju transkripcijsku aktivnost AP-1 proteina koji je povezan s procesima koji kontroliraju upalu, te diferencijaciju i proliferaciju stanica. Također, derivati kavene kiseline pokazali su se kao potencijalna antivirusna terapija kod infekcija HIV-om budući da selektivno i potentno inhibiraju HIV integrazu, enzim koji katalizira ugradnju virusne DNA u DNA stanica domaćina (16). Klorogenska kiselina i cinarin potiču pojačano lučenje žuči te na taj način pospešuju detoksikaciju organizma (20).

Aminokiseline, osim što imaju građevnu ulogu, štite biljku od osmotskog stresa koji može nastati kao posljedica suše i hladnoće, reguliraju transport iona i otvaranje puči, detoksificiraju teške metale, utječu na sintezu i aktivnost enzima, gensku ekspresiju te redoks ravnotežu (21).

Aminokiseline imaju brojne funkcije u ljudskom organizmu također, a one su povezane sa sintezom proteina i nukleinskih kiselina, staničnom signalizacijom, održavanjem acidobazne ravnoteže, tekom, rastom i razvojem, imunitetom, osmoregulacijom, endokrinim statusom, pigmentacijom, reprodukcijom, laktacijom, te ponašanjem (22). Iako je poznato da ljudski organizam sam ne može sintetizirati neke aminokiseline, koje su po tome dobile naziv esencijalne (23), ne treba zaboraviti da i takozvane neesencijalne aminokiseline imaju važnu ulogu u regulaciji genske ekspresije, stanične signalizacije, imuniteta, neurološke funkcije i antioksidativnom odgovoru. Istraživanja pokazuju da njihova sinteza u nekim skupinama, kao što su prerano rođena djeca ili žene u periodu laktacije, nije u skladu s potrebama organizma. Unos aminokiselina kao što su glutamin i arginin potiče rast i razvoj, obranu od oksidativnih oštećenja te pridonosi jačanju imuniteta. Novija istraživanja ukazuju također na

pozitivan učinak arginina kod pretilosti, hiperglikemije, hipertenzije, dislipidemije i kardiovaskularne disfunkcije (22).

S obzirom na primjenu zeleni kilavice u pučkoj medicini kod niza različitih tegoba, te različita biološka djelovanja koje posjeduju flavonoidi, fenolne kiseline i aminokiseline, cilj ovog rada bio je istražiti prisutnost navedenih spojeva u zeleni kilavice te odrediti količinu flavonoida i fenolnih kiselina.

## EKSPERIMENTALNI DIO

### Biljni materijal

U istraživanju su uporabljene osušene nadzemni dijelovi gole kilavice (*Herniaria glabra* L.) skupljeni u lipnju 2007. godine na području nedaleko Žute Lokve u Lici, na šumskoj čistini sa sitnim kamenjem (slika 5.). Identifikacija biljnog materijala provedena je ispitivanjem vanjske i unutrašnje građe skupljenog uzorka, usporedbom s literaturnim podacima (4, 5).

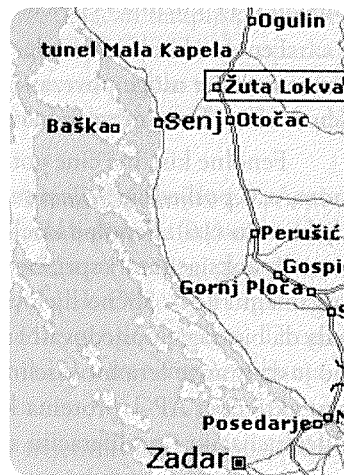
### Kvalitativna analiza flavonoida i fenolnih kiselina gole kilavice

Ispitivanje prisutnosti flavonoida provedeno je primjenom tankoslojne kromatografije na HPTLC pločama 20x10cm Kieselgel 60 F<sub>254</sub> uz smjesu otapala etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:26, V/V/V/V). Istraživanju su podvrgnuti metanolni ekstrakti zeleni gole kilavice pripremljeni tako da je 1 g praškasto usitnjenog uzorka ekstrahirano sa 10 mL metanola 5 minuta na vodenoj kupelji pri temperaturi od 60 °C. Bistri filtrat nakon hlađenja služio je kao otopina za kromatografsko ispitivanje.

Kao poredbene tvari korištene su 0,05 %-tne metanolne otopine flavonoida (izokvercitrin, luteolin, rutin) i fenolnih kiselina (kavena i klorogenska kiselina) (24). Detekcija odijeljenih flavonoida i fenolnih kiselina provedena je promatranjem fluorescencije pod UV zračenjem kod 365 nm nakon prskanja kromatograma modificiranim Naturstoff reagensom (NST/PEG). Reagens je pripremljen miješanjem 1 %-tne metanolne otopine  $\beta$ -etilaminoestera difenilboratne kiseline (NST) i 5 %-tne etanolne otopine polietilenglikola-4000 (PEG) (24, 25).

### Kvalitativna analiza aminokiselina gole kilavice

Ispitivanje prisutnosti aminokiselina tankoslojnom kromatografijom provedeno je na tankom sloju celuloze F, površine 10x20cm. Za ispitivanje su korišteni vodeni



Slika 5. Karta s ucrtanim nalazištem – Žuta Lokva

ekstrakti zeleni gole kilavice pripremljeni tako da je 1 g praškasto usitnjenog biljnog materijala ekstrahirano sa 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 alanina (Ala), asparaginske kiseline (Asp), fenilalanina (Phe), glicina (Gly), glutaminske kiseline (Glu), histidina (Hys), izoleucina (Ile), leucina (Leu) i treonina (Thr). Kao pokretna faza primijenjena je smjesa otapala: *n*-butanol – aceton – ledena octena kiselina – voda (35:35:10:20, V/V/V/V). Detekcija odijeljenih aminokiselina provedena je nakon prskanja kromatograma ninhidrin reagensom i grijanja 10 minuta na 100 °C (24).

#### Kvantitativna analiza flavonoida gole kilavice

Sadržaj flavonoida u istraživanim uzorcima određen je pomoću UV/Vis spektrofotometrije metodom prema Christu i Mülleru (26). 0,5 g usitnjenog uzorka ekstrahirano je sa 20 mL acetona, 2 mL 25 %-tne kloridne kiseline i 1 mL 0,5 %-tne vodene otopine heksametilentaamina zagrijavanjem do vrenja 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Hidrolizat je zatim propušten kroz pamuk u odmjernu tikvicu, a ostaci biljnog materijala na pamuku su ponovno ekstrahirani sa 20 mL acetona grijanjem do vrenja 10 minuta. Ova otopina je također propuštena kroz pamuk, a ekstrakcija acetonom ponovljena je još jedanput. Sjedinjeni filtrati razrijeđeni su do 100,0 mL acetonom. 20 mL hidrolizata pomiješano je sa 20 mL vode i ekstrahirano jedanput sa 15 mL, a zatim još triput sa 10 mL etilacetata. Sjedinjene etilacetatne faze isprane su dvaput sa 40 mL vode i propuštene kroz pamuk. Razrijeđene su etilacetatom do 50,0 mL. Po 10 mL ove otopine preneseno je u dvije odmjerne tikvice od 25,0 mL. U obje tikvice dodano je 0,5 mL 0,5 %-tne vodene otopine natrijevog citrata. U jednu tikvicu je dodano 2 mL otopine AlCl<sub>3</sub> (2 g aluminijevog klorida heksahidrata otopljeno u 100,0 mL 5 %-tne metanolne otopine octene kiseline), nakon čega je u obje tikvice do oznake dodana metanolna otopina octene kiseline.

Nakon 45 minuta izmjerena je apsorbancija otopine s aluminijevim kloridom u sloju debljine 1 cm kod 425 nm. Otopina bez aluminijevog klorida korištena je kao poredbena otopina. Ukupan sadržaj flavonoida izračunat je kao kvercetin prema izrazu:

% flavonoida izražen kao kvercetin –  $(A \times 0.772) / b$

A – apsorbancija

b – odvaga biljnog materijala u gramima

Količina flavonoida u istraživanom uzorku određena je triput, a rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

#### Kvantitativna analiza fenolnih kiselina gole kilavice

Sadržaj fenolnih kiselina određen je prema postupku opisanom u Europskoj farmakopeji (27). 0,200 g praška biljnog materijala (zeleni), zagrijavano je na vodenoj



kupelji sa 190 mL 50 %-tnog etanola 30 minuta uz povratno hladilo. Ohlađena smjesa je filtrirana u odmjernu tikvicu od 200,0 mL, filtar papir je ispran sa 10 mL etanola i tikvica dopunjena etanolom do oznake. U odmjernu tikvicu od 10,0 mL dodan je 1 mL etanolnog ekstrakta droge, 2 mL kloridne kiseline ( $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ), 2 mL otopine natrijevog nitrita s natrijevim molibdatom (10 g  $\text{NaNO}_2$  i 10 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  otopljeno u 100,0 mL vode) i 2 mL otopine natrijevog hidroksida (8,5 g  $\text{NaOH}$  otopljeno u 100,0 mL vode).

Apsorbancija je mjerena odmah na valnoj duljini od 505 nm uz poredbu s otopinom priređenu tako da se u odmjernu tikvicu od 10,0 mL doda 1 mL ekstrakta i 2 mL kloridne kiseline ( $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ), 2 mL otopine natrijevog hidroksida i dopunjuje se vodom do oznake. Sadržaj fenolnih kiselina izračunat je prema slijedećem izrazu:

% fenolnih kiselina izražen kao ružmarinska kiselina =  $A \times 5/m$

A – apsorbancija

m – masa biljnog materijala (g)

Količina fenolnih kiselina u istraživanom uzorku određena je triputom, a rezultat prikazan kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

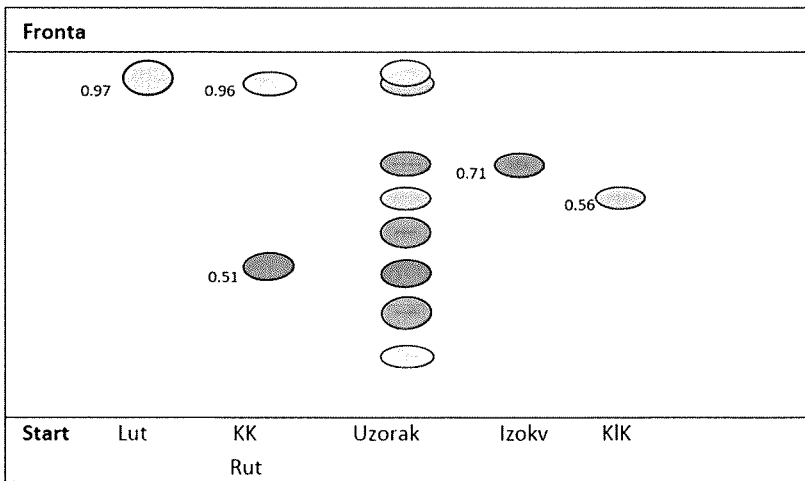
## REZULTATI I RASPRAVA

### Rezultati kvalitativne analize flavonoida i fenolnih kiselina

Tankoslojnom kromatografijom istražena je prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina tako što su prethodno pripremljeni uzorci za kromatografiju, odnosno metanolni ekstrakti zeleni gole kilavice. Razvijanje kromatograma u prosjeku je trajalo dva sata, a korištena je slijedeća pokretna faza: etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:26, V/V/V/V). Suha kromatografska ploča prskana je s NST/PEG reagensom i promatrana pod UV zračenjem na 365 nm, nakon čega su uočene mrlje narančaste, zelene i plave fluorescencije (slika 6.).

Obojenja nastaju odmah, a uvjetovana su strukturom flavonoidnih spojeva. Dodatkom PEG-a povisuje se granica detekcije. Narančaste fluorescencije karakteristične su za derivate kvercetina, miricetina i luteolina, a žutozeleno fluorescencije derivate kempferola, izoramnetina i apigenina (24).

Usporedbom fluorescencija mrlja i  $R_f$  vrijednosti sastavnica ekstrakta i poredbe s poznatim supstancijama, vidljivo je da najgornja sastavnica žute fluorescencije ( $R_f = 0,9$ ) odgovara luteolinu (Lut), slijedeća koja je plave fluorescencije ( $R_f = 0,96$ ) odgovara kavenoj kiselini (KK) te redom: mrlja narančaste fluorescencije ( $R_f = 0,71$ ) odgovara izokvercitrinu (Izokv), plave fluorescencije ( $R_f = 0,56$ ) klorogenskoj kiselini (KlK), zelene fluorescencije ( $R_f = 0,53$ ) prvom nepoznatom flavonoidu, narančaste fluorescencije ( $R_f = 0,51$ ) rutinu (Rut), narančaste fluorescencije ( $R_f = 0,28$ ) drugom nepoznatom flavonoidu te plave fluorescencije ( $R_f = 0,19$ ) nepoznatoj fenolnoj kiselini.



**Slika 6.** Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina zeleni gole kilavice.

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F<sub>254</sub>; Pokretna faza: etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:26, V/V/V/V); Detekcija: NST/PEG (UV-365 nm); Poredbene tvari: Lut – luteolin, KK – kavena kiselina, Rut – rutin, Izokv – izokvercitrin, KIK – klorogenska kiselina

### Rezultati kvalitativne analize aminokiselina

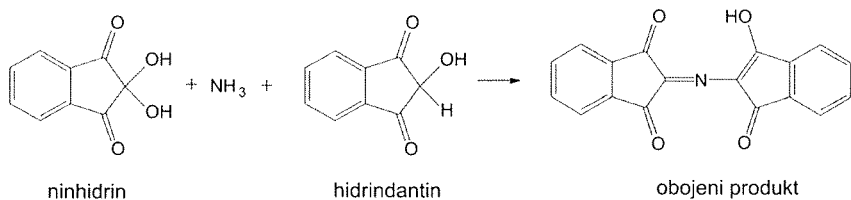
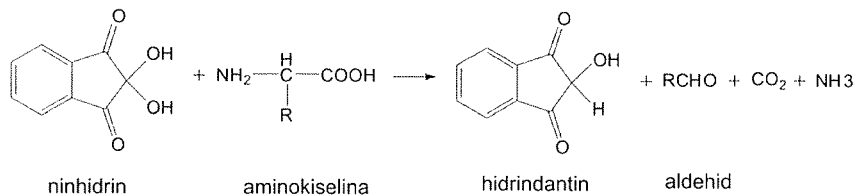
Vodeni ekstrakt zeleni gole kilavice podvrgnut je ispitivanju na prisutnost aminokiselina tankoslojnom kromatografijom. Kao mobilna faza primijenjena je smjesa otapala: *n*-butanol – aceton – ledena octena kiselina – voda (35:35:10:20, V/V/V/V) na nepokretnoj fazi celuloze F. Kromatogram je prskan ninhidrin reagensom te grijan 10 minuta na 100 °C, nakon čega je vidljivo deset mrlja u uzorku zeleni kilavice, različitih nijansi žute, narančaste i smeđe boje (slika 8.).

Ninhidrin je specifičan reagens za detekciju aminokiselina. Ljubičasta obojenja postaju vidljiva grijanjem na 100 °C (28). U reakciji ninhidrina s aminokiselinama nastaju mnogobrojni obojeni produkti, no najveći je udio produkata deaminacije i kondenzacije (slika 7.). Većina aminokiselina u ninhidrinskoj reakciji daje plavo obojenje koje grijanjem postaje ljubičasto. Izuzetak su iminokiseline (prolin) kod kojih nastaju žuto obojeni produkti (23, 29).

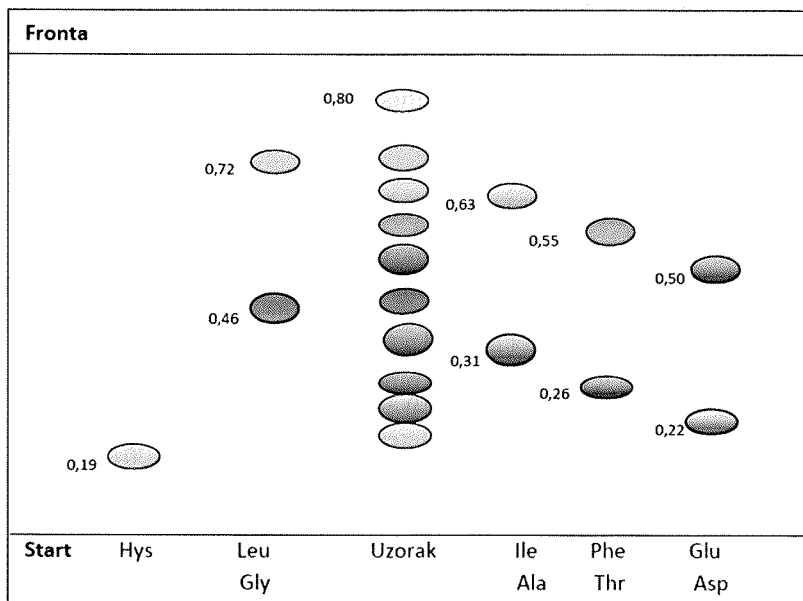
Usporedbom fluorescencija mrlja i  $R_f$  vrijednosti sastavnica ekstrakta i poredbenih supstancija vidljivo je da su u ispitivanom uzorku prisutne slijedeće aminokiseline: histidin ( $R_f = 0,19$ ), asparaginska kiselina ( $R_f = 0,22$ ), treonin ( $R_f = 0,26$ ), alanin ( $R_f = 0,31$ ), glicin ( $R_f = 0,46$ ), glutaminska kiselina ( $R_f = 0,50$ ), fenilalanin ( $R_f = 0,55$ ), izoleucin ( $R_f = 0,63$ ), leucin ( $R_f = 0,72$ ) i jedna nepoznata aminokiselina ( $R_f = 0,80$ ).

### Rezultati kvantitativne analize flavonoida i fenolnih kiselina

Metodom prema Christu i Mülleru (26) u zeleni kilavice utvrđen je sadržaj flavonoida od  $(0,29 \pm 0,0085)$  %.



Slika 7. Ninhidrijska reakcija (23)



Slika 8. Kromatogram aminokiselina zelene kilavice.

Nepokretna faza: celuloza F; Pokretna faza: *n*-butanol – aceton – ledena octena kiselina – voda (35:35:10 V/V/V/V); Detekcija: ninhidrin; Poredbene tvari: Hys – histidin, Leu – leucin, Gly – glicin, Ile – izoleucin, Ala – alanin, Phe – fenilalanin, Thr – treonin, Glu – glutaminska kiselina, Asp – asparaginska kiselina

Količina fenolnih kiselina, određena prema propisu iz Europske farmakopije (27), iznosila je  $(0,34 \pm 0,0021) \%$ .

Dobiveni rezultati kvantitativne analize flavonoida i fenolnih kiselina razlikuju se od onih prethodno objavljenih. Wojnicz i suradnici su primjenom UPLC-Q-TOF MS tehnike utvrdili da je sadržaj flavonoida u ekstraktu kilavice 6,9 mg/100 g suhe

materijala izraženo kao izokvercitrin (kvercetin-3-glukozid), dok je sadržaj fenolnih kiselina prikazan kao sadržaj estera kavene i kina kiseline, a iznosio je 10,2 mg/g suhog materijala (12). Prisutnost izokvercitrina potvrđena je u našem istraživanju primjenom tankoslojne kromatografije. U našem istraživanju količine flavonoida i fenolnih kiselina nisu izražene prema istim standardima, već je sadržaj flavonoida izražen kao kvercetin, a sadržaj fenolnih kiselina kao ružmarinska kiselina. Jedan od mogućih razloga za dobivene niže vrijednosti sadržaja istraživanih spojeva u našem istraživanju mogao bi biti i taj što su u prethodno navedenom istraživanju uzorci za analizu pripremljeni na drugačiji način, tj. kao otapalo je uporabljena destilirana voda i sama ekstrakcija je trajala mnogo duže nego u našem slučaju (8 sati kod 85 °C) (12).

## ZAKLJUČAK

Istraživanjem zeleni gole kilavice (*Herniariae herba*; *Herniaria glabra* L.) utvrđena je prisutnost flavonoida, fenolnih kiselina i aminokiselina. Primjenom tankoslojne kromatografije dokazana je prisutnost flavonoida izokvercitrina, luteolina, rutina i dvaju nepoznatih flavonoida, te fenolnih kiselina kavene, klorogenske i jedne nepoznate fenolne kiseline. Tankoslojnom kromatografijom utvrđena je i prisutnost slijedećih aminokiselina: alanina, asparaginske kiseline, fenilalanina, glicina, glutaminske kiseline, histidina, izoleucina, leucina i treonina. Rezultati UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja pokazali su da droga *Herniariae herba* sadrži 0,29 % flavonoida i 0,34 % fenolnih kiselina.

*Zahvale.* – »Prikazani rezultati proizašli su iz znanstvenog projekta (Farmakobotanička i kemijska karakterizacija cvjetnica hrvatske flore) provedenog uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske.

Zahvaljujemo dr. sc. Mišku Plazibatu s Botaničkog zavoda Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na skupljenom biljnom materijalu koji je uporabljen u ovom istraživanju.«

1. <http://hirc.botanic.hr/fcd/>, datum pristupa: 3.6.2013.
2. Kuštrak D. Farmakognozija – fitofarmacija. Zagreb: Golden marketing – Tehnička knjiga, 2005.
3. Böttger S, Melzig MF. Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family. *Phytochem. Lett.* 2011; 4:59–68.
4. Domac R. Flora Hrvatske – priručnik za određivanje bilja. 2. Izdanje. Zagreb: Školska knjiga, 2002.
5. Forenbacher S. Velebit i njegov biljni svijet. Zagreb: Školska knjiga, 1990.
6. <http://linnaeus.nrm.se/flora/>, datum pristupa: 3.6.2013.
7. Kušan F. Ljekovito i drugo korisno bilje. Zagreb: Poljoprivredni nakladni zavod, 1956.
8. Rhiouani H, El-Hilaly J, Israili ZH, Lyoussi B. Acute and sub-chronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 118:378–386.

9. Bećirević Laćan M, Begović-Dolinić V, Buhač I, Colnago F, Jurišić B, Medić-Šarić Nevečerel M, Smolčić-Bubalo A, Šušteršić T, Vrsalović M. *Formulae magistrales Croatiae*. Zagreb: Hrvatska ljekarnička komora, 2010.
10. Šarić-Kundalić B, Dobeš C, Klatte-Asselmeyer V, Saukel J. Ethnobotanical study of the medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. *J. Ethnopharmacol.* 2010; 131:33–55.
11. Wagner H. *Pharmazeutische Biologie – Drogen und ihre Inhaltsstoffe*. 2. Auflage. Stuttgart – New York: Gustav Fischer Verlag, 1988.
12. Wojnicz D, Kucharska AZ, Sokół-Letowska A, Kicia M, Tichaczek-Goska A. Medicinal plants extracts affect virulence factors expression and biofilm formation by the uropathogenic *Escherichia coli*. *Urol. Res.* 2012; 40:683–697.
13. Steinegger E, Hänsel R. *Pharmakognosie*. 5. Auflage. Berlin – Heidelberg – New York – Paris – Tokyo – Hong Kong – Barcelona – Budapest: Springer Verlag, 1992.
14. Geissman TA. *The chemistry of flavonoid compounds*. Oxford – London – New York – Paris: Pergamon Press, 1962.
15. Samanta A, Das G, Das SK. Roles of flavonoids in plants. *Int. J. Pharm. Sci. T.* 2011; 6:12–35.
16. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51:2866–2887.
17. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM, Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 74:418–425.
18. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 20:933–956.
19. Cook NC, Samman S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 1996; 7:66–76.
20. Steinegger E, Hänsel R, *Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie*. Berlin: Springer Verlag, 1988.
21. Rai VK. Role of aminoacids in plant responses to stresses. *Biol. Plantarum.* 2001; 45:481–487.
22. Wu G. Functional aminoacids in growth, reproduction, and health. *Adv. Nutr.* 2001; 1:31–37.
23. Stryer L. *Biokemija*. Zagreb: Školska knjiga, 1991.
24. Wagner H, Blatt S, Zgainski EM. *Drogenanalyse*. Berlin: Springer-Verlag, 1983.
25. Maleš Ž, Marin N, Plazibat M, Jelaković B. Istraživanje flavonoida i fenolnih kiselina u voćju stope – *Aristolochia clematitis* L. *Farm. Glas.* 2009; 65:623–633.
26. Christ B, Müller KH. Zur serienmässigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonoiden in Drogen. *Arch. Pharm.* 1960; 293:1033–1042.
27. *European Pharmacopoeia*. 6. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2007.
28. Berry HK, Leonard C, Peters H, Granger M, Chunekamrai N. Detection of metabolic disorders. Chromatographic procedures and interpretation of results. *Clin. Chem.* 1971; 14:1033–1065.
29. Pine SH. *Organska kemija*. Zagreb: Školska knjiga, 1994.

*Primljeno 28. kolovoza 2010.*