

Istraživanje flavonoida i fenolnih kiselina vučje stope - *Aristolochia clematitis* L.

Maleš, Željani; Marin, Nino; Plazibat, Miško; Jelaković, Bojan

Source / Izvornik: *Farmaceutski glasnik*, 2009, 65, 623 - 633

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:718231>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**



Repository / Repozitorij:

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



Istraživanje flavonoida i fenolnih kiselina vučje stoppe – *Aristolochia clematitis* L.

ŽELJAN MALEŠ¹, NINO MARIN¹, MIŠKO PLAZIBAT², BOJAN JELAKOVIĆ³

¹Zavod za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, ²Botanički zavod Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb,

³Zavod za nefrologiju i arterijsku hipertenziju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Investigation of flavonoids and phenolic acids of birthwort – *Aristolochia clematitis* L.

A b s t r a c t – *Aristolochia clematitis* is a herbaceous plant in the *Aristolochiaceae* family, which is native to Europe. A recent study suggests that it is the cause for thousands of kidney failures in Croatia, Romania, Bulgaria and Serbia where the plant is unintentionally consumed through flour. The plant contains aristolochic acid, this has received rather mixed reports on its toxicity. In this paper qualitative analysis of flavonoids and phenolic acids and quantitative analysis of flavonoids were carried out in the different plant organs of *A. clematitis* collected from five localities in Croatia. Thin-layer chromatographic analysis of investigated compounds showed the presence of isoquercitrin, rutin and caffeic acid. The quantity of flavonoids ranged from 0.01 to 0.71%. Leaves and flowers contained the highest content of flavonoids (0.38–0.71%).

(¹Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia, ²Department of Botany, Faculty of Science, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia and ³Department of Nephrology and Arterial Hypertension, University Hospital Center Zagreb and School of Medicine, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia)

UVOD

Vrsta *Aristolochia clematitis* L. (vučja stopa, žuta vučja stopa, vučja jabuka, divlja jabuka, kokotinja, zečja lubenica) pripada rodu *Aristolochia* L. i porodici *Aristolochiaceae* (1). U literaturi na engleskom jeziku može se naći pod nazivom *Birthwort*, a u njemačkoj literaturi pod nazivom *Osterluzei*.

Vučja stopa, *A. clematitis* višegodišnja je, zeljasta biljka člankovitog, puzavog, razgranjenog podanka, koji nije gomoljasto odebljao (bitna karakteristika kojom se ova vrsta razlikuje od ostalih pripadnika roda). Stabljika je uspravna, žutozelene boje, visoka 25–100 cm, nerazgranjena ili rjeđe razgranjena u gornjem dijelu. Listovi su veliki, 5–10 cm



Slika 1. Vučja stopa – *Aristolochia clematitis* L. (okolica Slavonskog Broda)

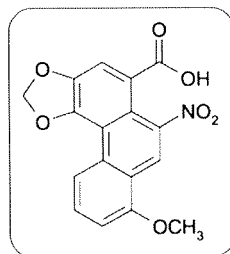
dugi i približno toliko široki, na razmjerno dugim peteljka, trokutasto jajasti, na bazi srcasti, na vrhu tupi. Cvjetovi su skupljeni u čuperke sastavljene od 2–8 cvjetova i nalaze se u pazušcima listova. Perigon je cjevast, svijetložute boje, pri dnu trbušasto proširen u obliku jabučice, a u gornjem dijelu produžen u jezičasti nastavak poput usne (slika 1.). Plodnica je 5–6 gradna. Plod je tobolac, kruškastog do kuglastog oblika, veličine oraha i sadrži mnogo trokutastih spljoštenih sjemenaka. Biljka cvate u svibnju i lipnju, a oprašuju ju sitni insekti koji, primamljeni osobito mirisom, ulaze kroz tanku cijev u donji dio cvijeta. Oprašivanje je popraćeno obamiranjem dlačica u cijevi što omogućuje oslobađanje insekata iz cjevastih cvjetova (2–4).

Ta je vrsta rasprostranjena u sredozemnom području i njegovu zaleđu te na području Balkana, Kavkaza i Male Azije. Unesena je u srednju Europu gdje se također rasprostranila. Sjeverno od Alpa rijetko donosi plod. U Hrvatskoj je rasprostranjena osobito u nizinskim predjelima te dopire najviše do 800 m nadmorske visine, a raste i u Istri i na otocima (2).

Vučja stopa je čest korov vinograda i oranica, a ponegdje i livada. Vrlo je žilava i otporna biljka kojoj odgovaraju plodna i suha, aluvijalna i vapnenasta tla, nitratima bogata mjesta te topla klima. Raste i uz rubove šuma, uz živice, plotove, putove, kanale, zidove i ruševine, željezničke nasipe i obale rijeka. Katkad je prisutna u velikom broju na neobrađenim njivama i u povrtnjacima, a nema je na uređenim pašnjacima (2, 3).

Svi dijelovi biljke, posebice sjemenke, sadrže alkaloid aristolohin i aristolohijsku kiselinu (slika 2.), koji su vrlo otrovni, zatim aristolaktame, flavonoide, amide, eterično ulje, taninsku kiselinu, jabučnu kiselinu i smole (5, 6, 7b).

Iako se čitava biljka smatra ljekovitom, ipak se najčešće upotrebljava samo podanak. Sabire se uglavnom u ožujku ili u rujnu i listopadu. U pučkoj medicini podanak se primjenjuje izvana, a služi brzom liječenju većih rana. U primjeni iznutra upotrebljava se kao sredstvo za čišćenje krvi ili za pospešenje menstruacije.



Slika 2.
Aristolohijska
kiselina

Smatra se i da u biljci prisutna aristolohijska kiselina pospješuje obrambenu snagu organizma protiv infekcija, poboljšavajući učinak djelovanja bijelih krvnih zrnaca (7a). Poznato je da upravo aristolohijska kiselina, kao jaki kapilarni otrov, uzrokuje u prvom redu teško oštećenje bubrega i jetre, a djeluje i na središnji živčani sustav. Pretpostavlja se i da dugogodišnje unošenje čak i vrlo malih količina aristolohijske kiseline u organizam uzrokuje ili je jedan od uzroka nastanka endemske bolesti bubrega, balkanske endemske nefropatije (BEN). Pri akutnom trovanju biljkom javlja se lagana upala sluznice, nadražaj na povraćanje i vrtoglavica, dok pri jačim trovanjima dolazi do upale crijeva, grčeva s trzanjem, klijenuti disanja i klijenuti srca (4).

Cilj ovog rada bilo je istraživanje kemijskog sastava vučje stope, odnosno ispitivanje prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina te određivanje količine flavonoida.

EKSPERIMENTALNI DIO

Materijal za istraživanje

U biljnom materijalu upotrebljenom za istraživanje bili su cvjetovi (C), listovi (L), plodovi (Pl), podanak (P) i stabljike (S) vučje stope – *A. clematitis*, skupljeni na pet lokacija (označeni brojevima 1–5), tijekom kasnoga proljeća i ranoga ljeta 2004. godine. Četiri se lokacije nalaze u okolici Slavenskog Broda, dok je peta lokacija područje Zagreba. Biljke iz okolice Slavenskog Broda skupljene su uz puteve, riječna korita, na oranicama i uz rubove šuma 13. lipnja (uzorci 1–3) i 2. srpnja (uzorci 4), a biljke sa zagrebačkoga područja 20. svibnja (uzorci 5) uz lijevu obalu Save, u cvatu, na aluvijalnom tlu u blizini riječnoga toka (tablica 1.).

Tablica 1. Podaci o istraživanim uzorcima

Oznaka uzorka	Vrsta uzorka	Nalazište	Datum skupljanja
L ₁	List	Slavonski Brod 1	13.06.2004.
P ₁	Podanak	Slavonski Brod 1	13.06.2004.
S ₁	Stabljika	Slavonski Brod 1	13.06.2004.
C ₂	Cvijet	Slavonski Brod 2	13.06.2004.
L ₂	List	Slavonski Brod 2	13.06.2004.
P ₂	Podanak	Slavonski Brod 2	13.06.2004.
S ₂	Stabljika	Slavonski Brod 2	13.06.2004.
L ₃	List	Slavonski Brod 3	13.06.2004.
P ₃	Podanak	Slavonski Brod 3	13.06.2004.
S ₃	Stabljika	Slavonski Brod 3	13.06.2004.
L ₄	List	Slavonski Brod 4	02.07.2004.
Pl ₄	Plod	Slavonski Brod 4	02.07.2004.
P ₄	Podanak	Slavonski Brod 4	02.07.2004.
S ₄	Stabljika	Slavonski Brod 4	02.07.2004.
C ₅	Cvijet	Zagreb	20.05.2004.
L ₅	List	Zagreb	20.05.2004.
P ₅	Podanak	Zagreb	20.05.2004.
S ₅	Stabljika	Zagreb	20.05.2004.

1. Identifikacija biljnog materijala

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

2. Istraživanje prisutnosti flavonoida i fenolnih kiselina tankoslojnom kromatografijom

Istraživanju su podvrgnuti metanolni ekstrakti cvjetova, listova, plodova, podanaka i stabljika vučje stope. Poredbene supstancije primijenjene u istraživanju bile su flavonoidi – kvercetin, izokvercitrin, rutin i kvercitrin, a kao fenolne kiseline – kavena i klorogenska kiselina. Rabljene 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 pri 60 °C. Bistri filtrat nakon hlađenja, služio je kao otopina za kromatografsko ispitivanje (8, 9).

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) (8).

Ekstrakti su nanosili 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 specifičan je reagens za detekciju flavonoida. Obojenja nastaju odmah, a uvjetovana su strukturom flavonoidnih spojeva (8).

3. Određivanje količine flavonoida

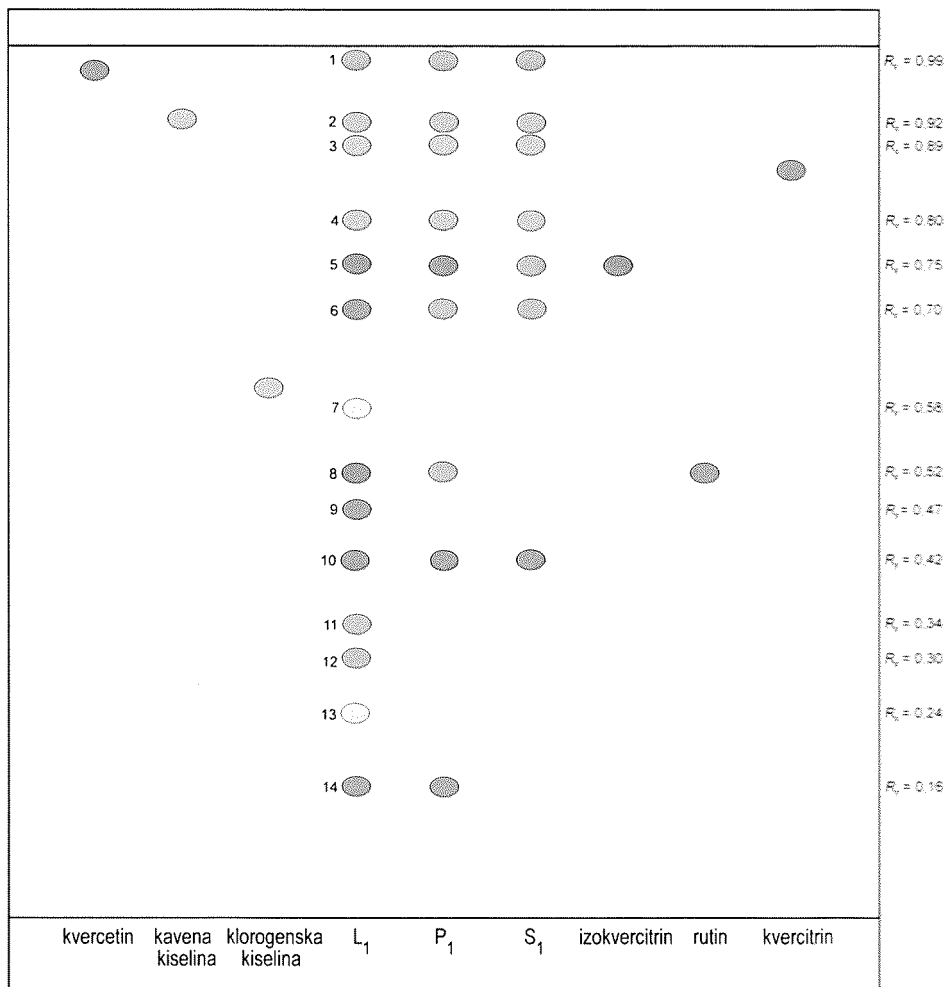
Sadržaj flavonoida u upotrebljenim uzorcima određen je metodom prema Christu i Mülleru (10), koja se temelji na određivanju ukupnih flavonoidnih aglikona nakon stvaranja kompleksa s Al³⁺ (9, 11, 12). Količina flavonoida u svim uzorcima određena je tri puta, a iz dobivenih rezultata izračunane su srednje vrijednosti i standardne devijacije.

REZULTATI I RASPRAVA

1. Kvalitativna analiza flavonoida i fenolnih kiselina

Svi su uzorci vučje stope ispitani na prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina metodom tankoslojne kromatografije. Primijenjeni su metanolni ekstrakti različitih biljnih dijelova (cvijet, list, plod, podanak i stabljika) kao uzorci, smjesa otapala etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda (100:11:11:26 v/v/v/v) kao mobilna faza te NST/PEG reagens za detekciju. Nakon prskanja ploča i promatranja pod UV zračenjem, valne duljine 365 nm, uočene su narančaste, žutozelene i plave fluorescirajuće mrlje.

Na prvoj su ploči ispitani list, podanak i stabljika. U uzorku lista (L_1) uočeno je 14 mrlja, u uzorku podanka (P_1) 9 mrlja te stabljike (S_1) 7 mrlja. Usporedbom fluorescencija mrlja i R_F vrijednosti sastavnica ekstraktata i poredbenih supstancija vidljivo je da sastavnica 2 svih uzoraka plave fluorescencije ($R_F = 0,92$) odgovara kavenoj kiselini, sastavnica 5 svih uzoraka narančaste i žutonarančaste fluorescencije ($R_F = 0,75$) odgovara izokvercitrinu, a sastavnica 8 uzoraka L_1 i P_1 narančaste i žutonarančaste fluorescencije ($R_F = 0,52$) odgovara rutinu (slika 3.).



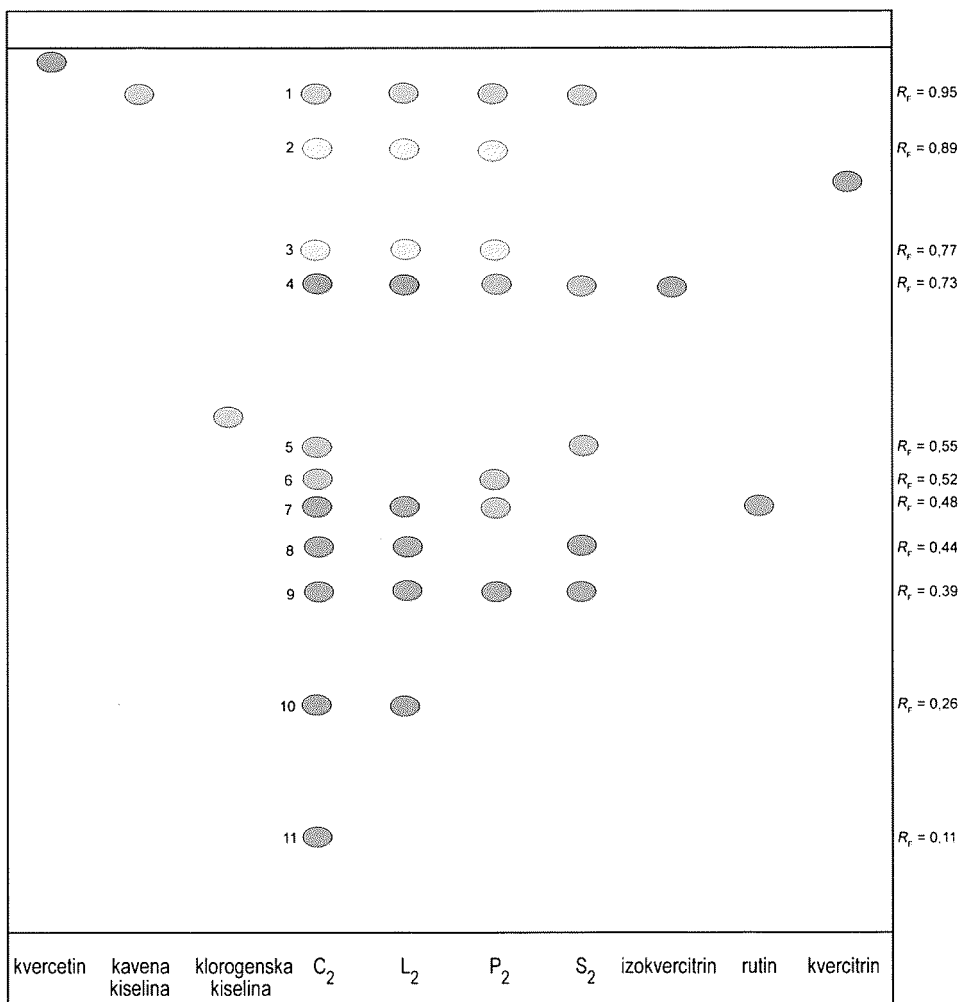
Slika 3. Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina uzorka 1 vučje stope

Nepokretna faza: Kiesegel 60 F₂₅₄

Pokretna faza: etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda
(100:11:11:26 v/v/v/v)

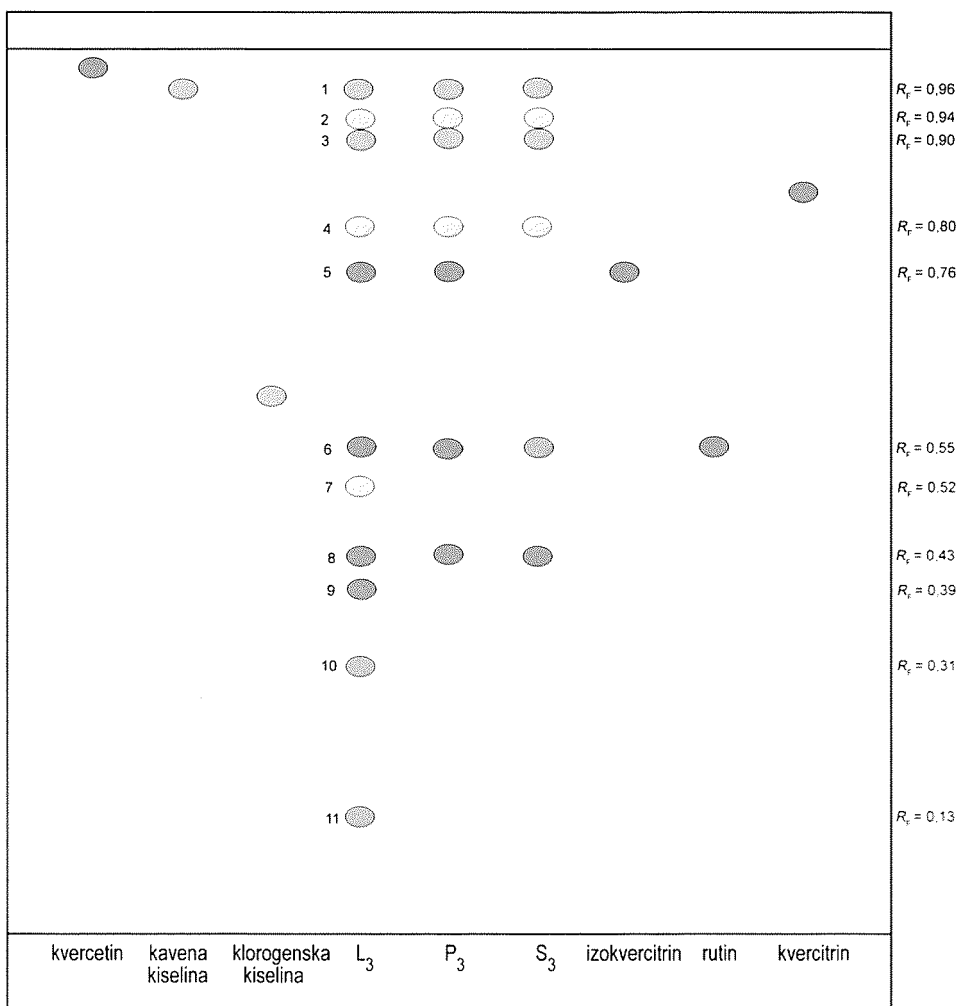
Detekcija: NST/PEG (UV-365 nm)

Na drugoj su ploči ispitani cvijet (C_2), list (L_2), podanak (P_2) i stabljika (S_2). Uzorak cvijeta ima 11 mrlja, lista 8, podanka 7, a stabljike 5 mrlja. Sastavnica 1 svih uzoraka plave fluorescencije ($R_f = 0,95$) odgovara kavenoj kiselini, sastavnica 4 svih uzoraka narančaste i žutonarančaste fluorescencije ($R_f = 0,73$) odgovara izokvercitrinu, a sastavnica 7 uzoraka C_2 , L_2 i P_2 narančaste fluorescencije ($R_f = 0,48$) odgovara rutinu (slika 4.).



Slika 4. Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina uzorka 2 vučje stope
 Nepokretna faza: Kieselgel 60 F_{254}
 Pokretna faza: etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda
 (100:11:11:26 v/v/v/v)
 Detekcija: NST/PEG (UV-365 nm)

Na trećoj su ploči ispitana tri uzorka (L₃, P₃, S₃). Uzorak lista (L₃) ima 11 mrlja, podanka (P₃) 7 mrlja i stabljike (S₃) 6 mrlja. U ovom je slučaju, usporedbom fluorescencija mrlja i R_F vrijednosti, vidljivo da sastavnica 1 svih uzoraka plave fluorescencije (R_F = 0,96) odgovara kavenoj kiselini, sastavnica 5 uzoraka L₃ i P₃ narančaste fluorescencije (R_F = 0,76) odgovara izokvercitrinu, a sastavnica 6 svih uzoraka narančaste i žutonarančaste fluorescencije (R_F = 0,55) odgovara rutin (slika 5.).



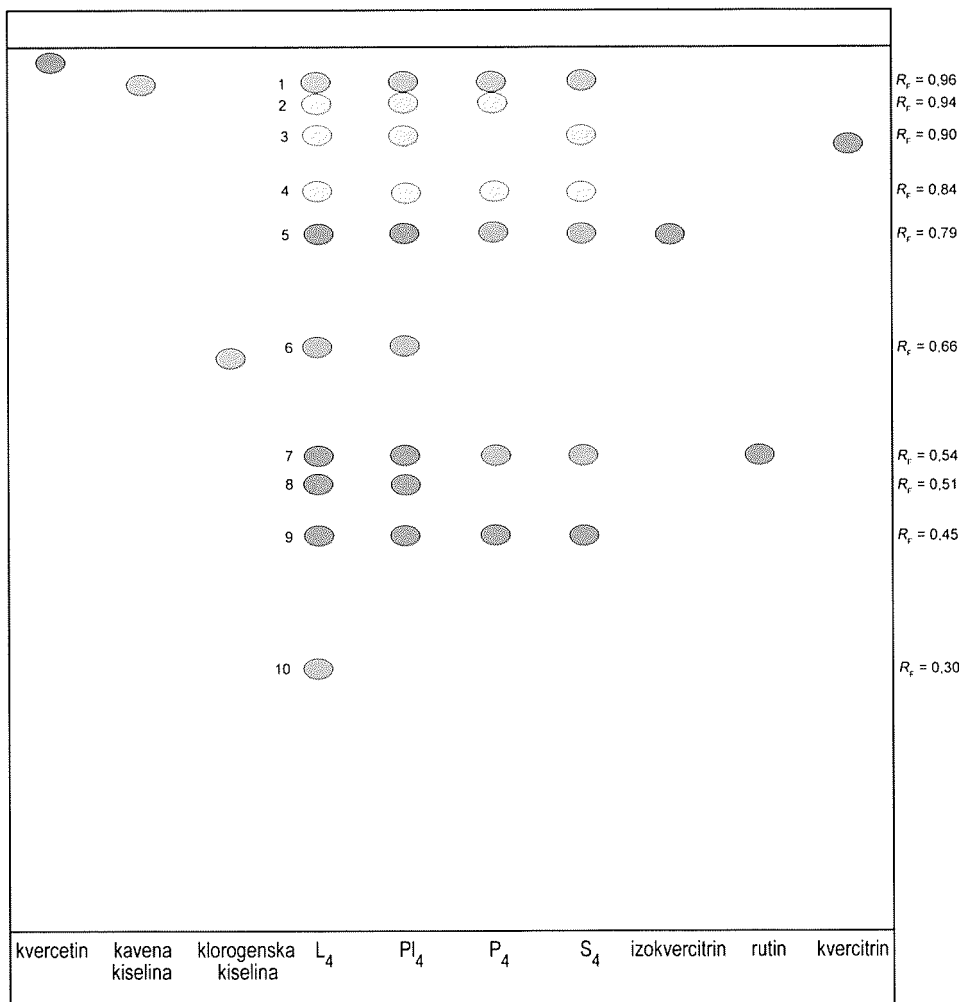
Slika 5. Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina uzorka 3 vučje stope

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)

Na četvrtoj su ploči ispitani list (L_4), plod (Pl_4), podanak (P_4) i stabljika (S_4). Uzorak lista ima 10 mrlja, plod ima 9 mrlja, a podanak i stabljika 6 mrlja. Sastavnica 1 svih uzoraka plave fluorescencije ($R_F = 0,96$) odgovara kavenoj kiselini, sastavnica 5 svih uzoraka narančaste i žutonarančaste fluorescencije ($R_F = 0,79$) odgovara izokvercitrinu, a sastavnica 7 svih uzoraka narančaste i žutonarančaste fluorescencije ($R_F = 0,54$) odgovara rutin (slika 6.).



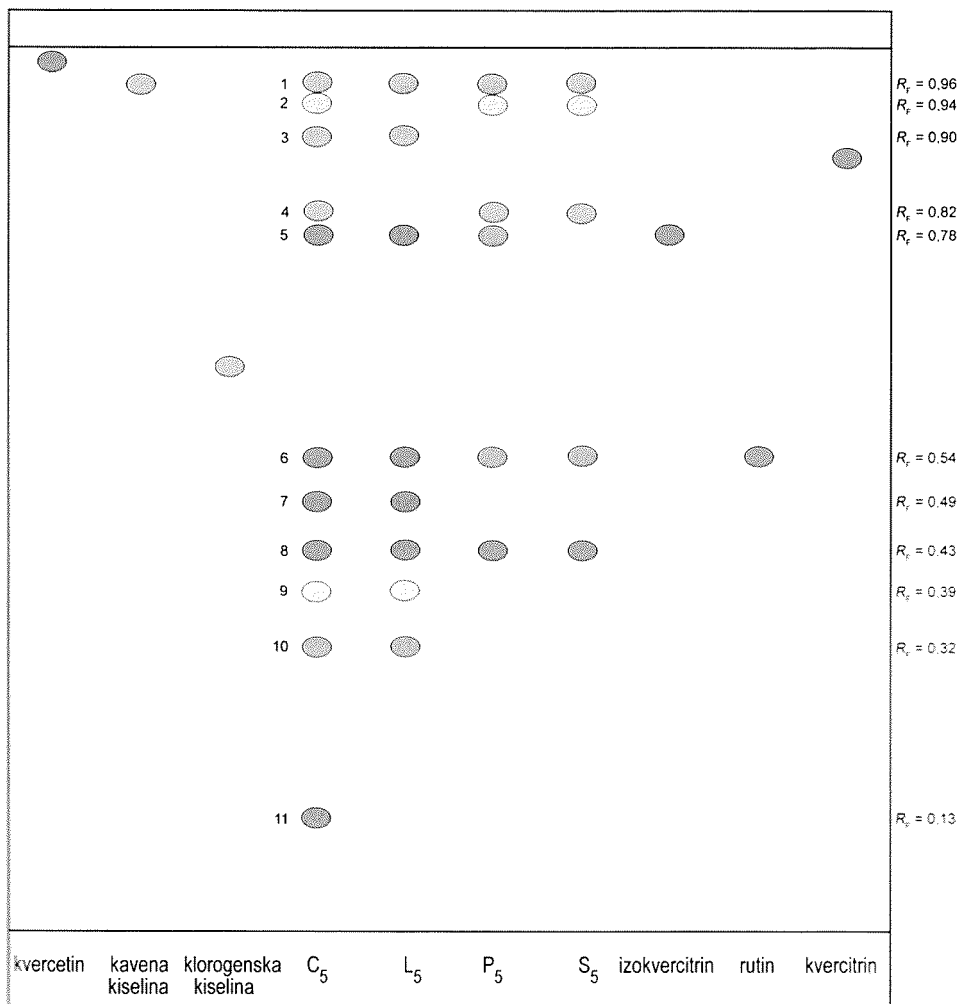
Slika 6. Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina uzorka 4 vučje stope

Nepokretna faza: Kieselgel 60 F_{254}

Pokretna faza: etilacetat – mravlja kiselina – ledena octena kiselina – voda
(100:11:11:26 v/v/v/v)

Detekcija: NST/PEG (UV-365 nm)

Na petoj su ploči ispitani cvijet (C₅), list (L₅), podanak (P₅) i stabljika (S₅). Uzorak cvijeta ima 11 mrlja, lista 8, podanka 6, a stabljike 5 mrlja. Sastavnica 1 svih četiriju uzoraka plave fluorescencije (R_F = 0,96) odgovara kavenoj kiselini, sastavnica 5 uzoraka C₅, L₅ i P₅ narančaste fluorescencije (R_F = 0,78) odgovara izokvercitrinu, a sastavnica 6 svih uzoraka narančaste i žutonarančaste fluorescencije (R_F = 0,54) odgovara rutinu (slika 7.).



Slika 7. Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina uzorka 5 vučje stope

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)

U svim istraživanim uzorcima utvrđena je prisutnost mrlja narančaste i žutonarančaste, odnosno plave fluorescencije, koje bi također mogle pripadati flavonoidima i fenolnim kiselinama. R_F vrijednosti tih mrlja sastavnica uzoraka ne odgovaraju R_F vrijednostima mrlja ostalih upotrijebljenih standarda.

2. Kvantitativna analiza flavonoida

Kvantitativna analiza flavonoida u svim je uzorcima provedena metodom prema Christu i Mülleru. Rezultati analize prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Udio flavonoida u istraživanim uzorcima

uzorak	% flavonoida ($\bar{x} \pm S_b$)
C ₁	0,50 ± 0,040
C ₅	0,60 ± 0,010
L ₁	0,46 ± 0,007
L ₂	0,38 ± 0,092
L ₃	0,56 ± 0,007
L ₄	0,57 ± 0,010
L ₅	0,71 ± 0,014
P ₁	0,02 ± 0,007
P ₂	0,01 ± 0,005
P ₃	0,01 ± 0,002
P ₄	0,02 ± 0,008
P ₅	0,27 ± 0,040
S ₁	0,19 ± 0,036
S ₂	0,01 ± 0,001
S ₃	0,05 ± 0,008
S ₄	0,09 ± 0,054
S ₅	0,08 ± 0,005

Kvantitativna analiza flavonoida vučje stope pokazala je da istraživani uzorci sadrže 0,01–0,71% flavonoida. Vidljiva je bitna razlika u udjelu flavonoida ovisno o ispitanim biljnim organima. Najviše flavonoida imaju uzorci lista (0,38–0,71%) i cvijeta (0,50–0,60%), zatim stabljike (u prosjeku 0,08%), a najmanji postotak flavonoida sadrže uzorci podanka (u prosjeku 0,06%). Vidljiva je i jasna razlika u udjelu flavonoida uzoraka koji potječu s područja Slavenskog Broda (uzorci 1–4) i s područja Zagreba (uzorci 5). Udio flavonoida zagrebačkih uzoraka cvjetova, listova i podanaka veći je od udjela flavonoida u uzorcima s područja Slavenskog Broda.

ZAKLJUČAK

Istraživanjem cvjetova, listova, plodova, podanaka i stabljika vučje stope, *Aristolochia clematitis*, utvrđena je prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina.

Metodom tankoslojne kromatografije dokazana je prisutnost sljedećih flavonoida i fenolnih kiselina: izokvercitrina, rutina i kavene kiseline. S obzirom na intenzitet obojenih mrlja, kao što je potvrđeno i kvantitativnom analizom, može se zaključiti da različiti biljni dijelovi ne sadrže jednaku količinu flavonoida. Najviše flavonoida sadrže cvjetovi i listovi (0,38–0,71%). Sadržaj flavonoida također varira ovisno o vremenu i lokaciji skupljanja. Najviše flavonoida sadrže biljni dijelovi uzoraka skupljenih na zagrebačkom području, s iznimkom stabljike.

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

Literatura – References

1. R. Domac, Flora Hrvatske – Priručnik za određivanje bilja (II. Izdanje), Školska knjiga, Zagreb 2002, 90.
2. S. Forenbacher, Otrovnne biljke i biljna otrovanja životinja, Školska knjiga, Zagreb 1998, 115.
3. I. Trinajstić, *Aristolochia* L. In I. Trinajstić Ed. Analitička flora Jugoslavije 1 (2), Institut za botaniku Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb 1973, 219.
4. F. Kušan, Ljekovito i drugo korisno bilje, Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb 1956, 196.
5. S. F. Palmeira, L. M. Conserva, M. S. S. Correa, G. M. S. P. Guilhon, *Biochem. Syst. Ecol.* **30** (2002) 701.
6. F. J. C. Carneiro, N. Boralle, D. H. S. Silva, L. M. X. Lopes, *Phytochemistry* **55** (2000) 823.
7. H. Wagner, *Pharmazeutische Biologie – Drogen und ihre Inhaltsstoffe* (2. Auflage), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart – New York 1982, a) 384, b) 423.
8. H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski, *Drogenanalyse*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1983, 163.
9. Ž. Maleš, M. Plazibat, V. Bilušić Vundać, D. Kremer, J. Alar, *Farm. Glas.* **61** (2005) 499.
10. B. Christ, K. H. Müller, *Arch. Pharm.* **293** (1960) 1033.
11. Ž. Maleš, F. Šarić, *Farmaceutski Glasnik* **65** (2009) 143.
12. Ž. Maleš, K. Hazler Pilepić, M. Bojić, S. Jebrini, *Farm. Glas.* **65** (2009) 217.

Primljeno 4. rujna 2009.