

Fitokemijsko istraživanje krškog kukurijeka - *Helleborus multifidus* Vis. subsp. *multifidus*

Maleš, Željko; Plazibat, Miško

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2000, 56, 367 - 374**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:152587>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

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



Fitokemijsko istraživanje krškog kukurijeka – *Helleborus multifidus* Vis. subsp. *multifidus*

ŽELJAN MALEŠ¹ i MIŠKO PLAZIBAT²

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

Phytochemical investigation of *Helleborus multifidus* Vis. subsp. *multifidus*

S u m m a r y – Flavonoids (isoquercitrin, hyperoside, other derivatives of quercetin and derivative of kaempferol) and chlorogenic acid were identified in the methanolic and ethylacetatic extracts of the leaves of *Helleborus multifidus* Vis. subsp. *multifidus*. Pyrogallol tannins were proved in the aqueous extract upon the colours and precipitates with metallic salts and gelatine. The results of the spectrometric determination showed that leaves contain 0.51% flavonoids, 4.83% total polyphenols and 2.35% tannins.

(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

Helleborus multifidus Vis. subsp. *multifidus* – krški kukurijek zeljasta je trajnica iz porodice *Ranunculaceae*, reda *Berberidales*, razreda *Magnoliatae* (1). Pod zemljom ima jaki kvrgavi podanak smeđe boje na kojem je vlaknasto korijenje iste boje. Stabljika je uspravna do 50 cm visoka s 2–3 ogranka s ponekim listom te s manje od osam cvjetova. Prizemni listovi su kožasti ili polukožasti, nisu zimzeleni, s peteljka koje imaju uzdužnu ventralnu brazdu i s plojkama isjeckanim na različiti broj odsječaka kojih može biti manje od 10 (oligofidni tip) pa sve do više od 40 (multifidni tip). Listovi stabljike nalik su na prizemne, samo što su manji, sjedeći i s manjim brojem odsječaka. Cvjetovi su na povijenim dlakavim stapkama nejednake dužine, promjera 3–6 cm, a kod tipične podvrste obojeni su nijansama zelene boje. Najčešće ima pet plodnica, koje su u donjem dijelu srasle, dok je prašnika mnogo. Plodovi su višesjemeni mjehuri duguljastog oblika sa šiljcima na vrhu (*Slika 1.*). Sjemenke su također duguljaste, kestenjastosmeđe ili crne boje s uočljivim površinskim sjajem (2–4).

Helleborus multifidus Vis. je izrazito polimorfna vrsta koja se u djelu Flora Europaea dijeli na tri podvrste: *Helleborus multifidus* Vis. subsp.



Slika 1. *Helleborus multifidus* Vis. subsp. *multifidus* – Krški kukurijek

istriacus (Schiffner) Merxm. et Podl., *H. multifidus* Vis. subsp. *multifidus* i *H. multifidus serbicus* (Adamović) Merxm. et Podl. (5,6). Tipičnu podvrstu (*H. multifidus* Vis subsp. *multifidus*) lako je razlikovati od ostalih dviju po obliku listova i po cvjetovima zelene boje. Ova podvrsta rasprostranjena je u Dinaridima od Slovenije sve do Albanije, dok je dvojbeno njeno pojavljivanje izvan tog areala. Raste na vapnenačkoj i dolomitnoj podlozi od primorskih pa sve do viših gorskih položaja u kontinentalnim krajevima. Staništa ove biljne svojte najčešća su u području termofilnih šuma hrasta medunca s bijelim ili crnim grabom, u makiji, po kamenjarima te u manjoj mjeri i na mjestima prevladavanja bukovih šuma (2,4,5,7).

U literaturi nisu nađeni podaci o istraživanju flavonoida krškog kukurijeka. Zato je cilj ovog rada bio utvrditi nazočnost flavonoida, fenolnih kiselina i trjeslovina te kvantitativno analizirati flavonoide i trjeslovine u listovima navedene biljke.

EKSPERIMENTALNI DIO

Biljni materijal

Materijal za ispitivanje sastojao se od listova krškog kukurijeka – *Helleborus multifidus* Vis. subsp. *multifidus* skupljenih 22. lipnja 1999. na Vele-

bitu po jugozapadnim padinama Crnopca, nedaleko od Gračaca, na oko 780 m nadmorske visine.

1. Identifikacija biljnog materijala

Identitet istraživane biljne svojte potvrdila su ispitivanja vanjske i unutarnje građe skupljenog uzorka (2–5).

2. Ispitivanje nazočnosti flavonoida i fenolnih kiselina tankoslojnom kromatografijom

Ispitivan je ekstrakt listova krškog kukurijeka, koji je pripremljen tako da je 1 g praškasto usitnjenih listova ekstrahirano s 10 ml metanola 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Bistri filtrat nakon hlađenja, služio je kao otopina za kromatografsko ispitivanje (8). Kao poredbene supstancije uporabljene su 0,05%-tne metanolne otopine izokvercitrina, klorogenske kiseline, hiperozida i rutina.

Pri ispitivanju nazočnosti flavonoidnih aglikona u listovima krškog kukurijeka uporabljen je etilacetatni ekstrakt dobiven u postupku hidrolize pri spektrofotometrijskom određivanju ukupnog sadržaja flavonoida prema Christu i Mülleru (9). Kao poredbene supstancije primijenjene su 0,05%-tne metanolne otopine kvercetina i kemferola.

Ispitivanje nazočnosti flavonoida i fenolnih kiselina provedeno je na tankom sloju Kieselgel 60 F₂₅₄ u tri smjese otapala: etilacetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:27 V/V/V/V) (8), etilacetat-mravlja kiselina-voda (8:1:1 V/V/V) (10) i toluen-etilformijat-mravlja kiselina (5:4:1 V/V/V) (11).

Detekcija odijeljenih flavonoida i fenolnih kiselina provedena je promatranjem pod UV zračenjem pri 365 nm nakon prskanja kromatograma modificiranim Naturstoff reagensom (NST/PEG) (8).

3. Određivanje količine flavonoida

Količina flavonoida u uzorku listova krškog kukurijeka određena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (9), koja se temelji na određivanju ukupnih flavonoidnih aglikona nakon stvaranja kompleksa s Al³⁺ u smjesi metanola, etilacetata i octene kiseline.

4. Dokazivanje trjeslovina reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga

Dokazivanje trjeslovina provedeno je tako da se 1 g praškasto usitnjenih listova zagrijava sa 100 ml destilirane vode na vodenoj pari uz povratno hladilo 15 minuta. Dobivena se iscrpina nakon hlađenja filtrira, a filtrat rabi za reakcije (12).

Opće reakcije za dokazivanje trjeslovina provedene su s otopinama željezo(III)-klorida, željezo(III)-amonij-sulfata, olovo-subacetata i želatine. Reakcija na flobatanine provedena je s formaldehidom i kloridnom kiselinom, a reakcija na pirogalolske trjeslovine s natrij-acetatom i željezo(III)-amonij-sulfatom (12–15).

Za dokazivanje katehinskih trjeslovina 0,2 g praškasto usitnjenih listova pomiješano je s 10 ml metanola, zagrijano do vrenja i filtrirano. Zatim je 1 ml filtrata pomiješan s 0,5 ml otopine vanilina i 1 ml koncentrirane kloridne kiseline (12).

5. Određivanje količine ukupnih polifenola i trjeslovina

Određivanje je provedeno spektrofotometrijskom metodom prema Schneideru (16) koja se temelji na taloženju trjeslovina s kazeinom.

REZULTATI I RASPRAVA

1. Kvalitativna analiza flavonoida i fenolnih kiselina

Metanolni ekstrakt listova krškog kukurijeka (Em) ispitan je na nazočnost flavonoida i fenolnih kiselina tankoslojnom kromatografijom. Nakon prskanja kromatograma NST/PEG reagensom i promatranjem pod UV zračenjem na 365 nm, uočene su narančaste, zelenožute te plave fluorescencije.

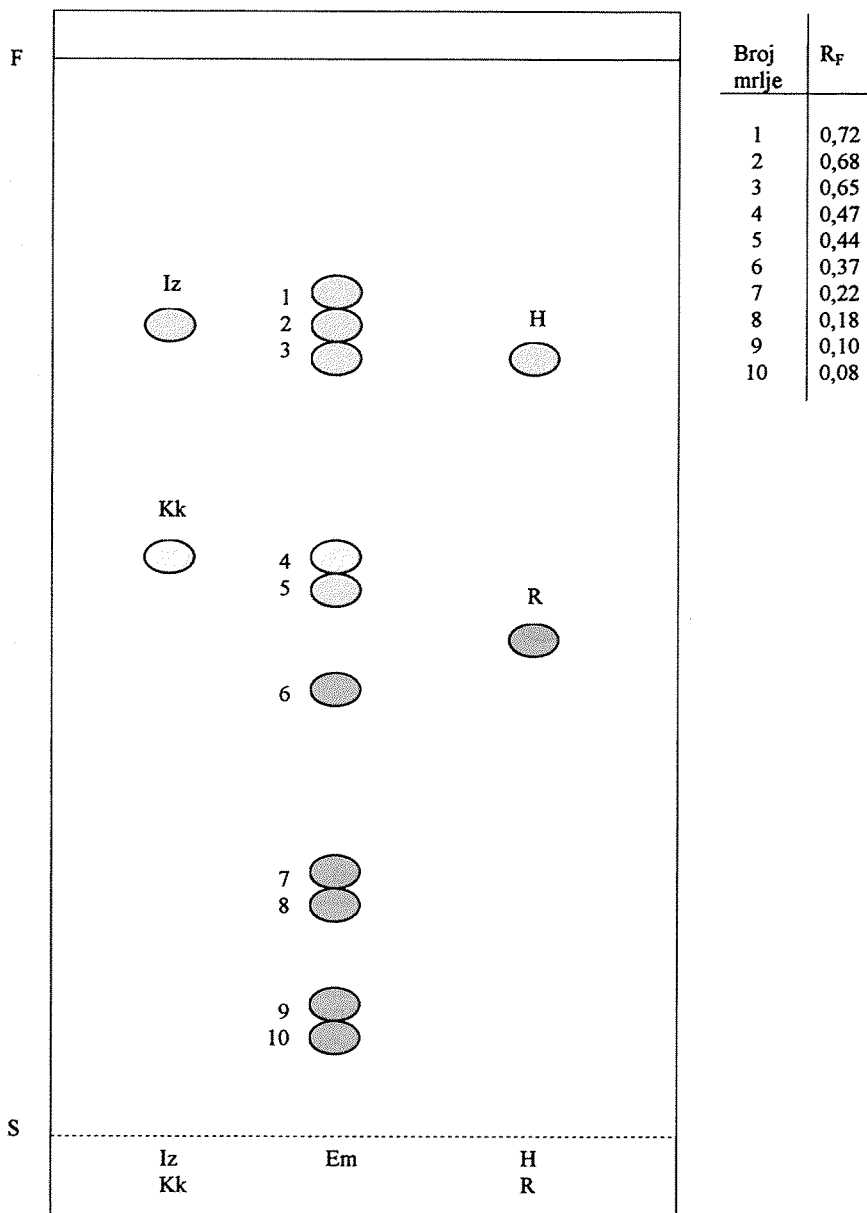
Odjeljivanjem mobilnom fazom etilacetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:27 V/V/V/V) u ekstraktu listova krškog kukurijeka uočava se 10 mrlja (Slika 2.). Usporedbom fluorescencija mrlja i R_F vrijednosti sastavnica ekstrakta i poredbenih supstancija vidljivo je da sastavnica 2 narančaste fluorescencije ($R_F = 0,68$) odgovara flavonolskom heterozidu izokvercitrinu (Iz), sastavnica 3 narančaste fluorescencije ($R_F = 0,65$) flavonolskom heterozidu hiperozidu (H), a sastavnica 4 plave fluorescencije ($R_F = 0,47$) klorogenskoj kiselini (Kk). U gornjem R_F području ($R_F = 0,72$) ističe se sastavnica 1 narančaste fluorescencije, a u donjem R_F području uočava se pet sastavnica intenzivne narančaste fluorescencije (sastavnice 6–10), koje bi mogle predstavljati flavonoidne heterozide polarnije od flavonolskog heterozida rutina. I sastavnica 5 ($R_F = 0,44$) zelenožute fluorescencije mogla bi predstavljati flavonoidni heterozid – derivat kemferola.

Slična kromatografska slika dobivena je odjeljivanjem smjesom otapala etilacetat-mravlja kiselina-voda (8:1:1 V/V/V) (Slika 3.). Jedina je razlika u odnosu na Sliku 2. niže R_F vrijednosti flavonoida i fenolnih kiselina.

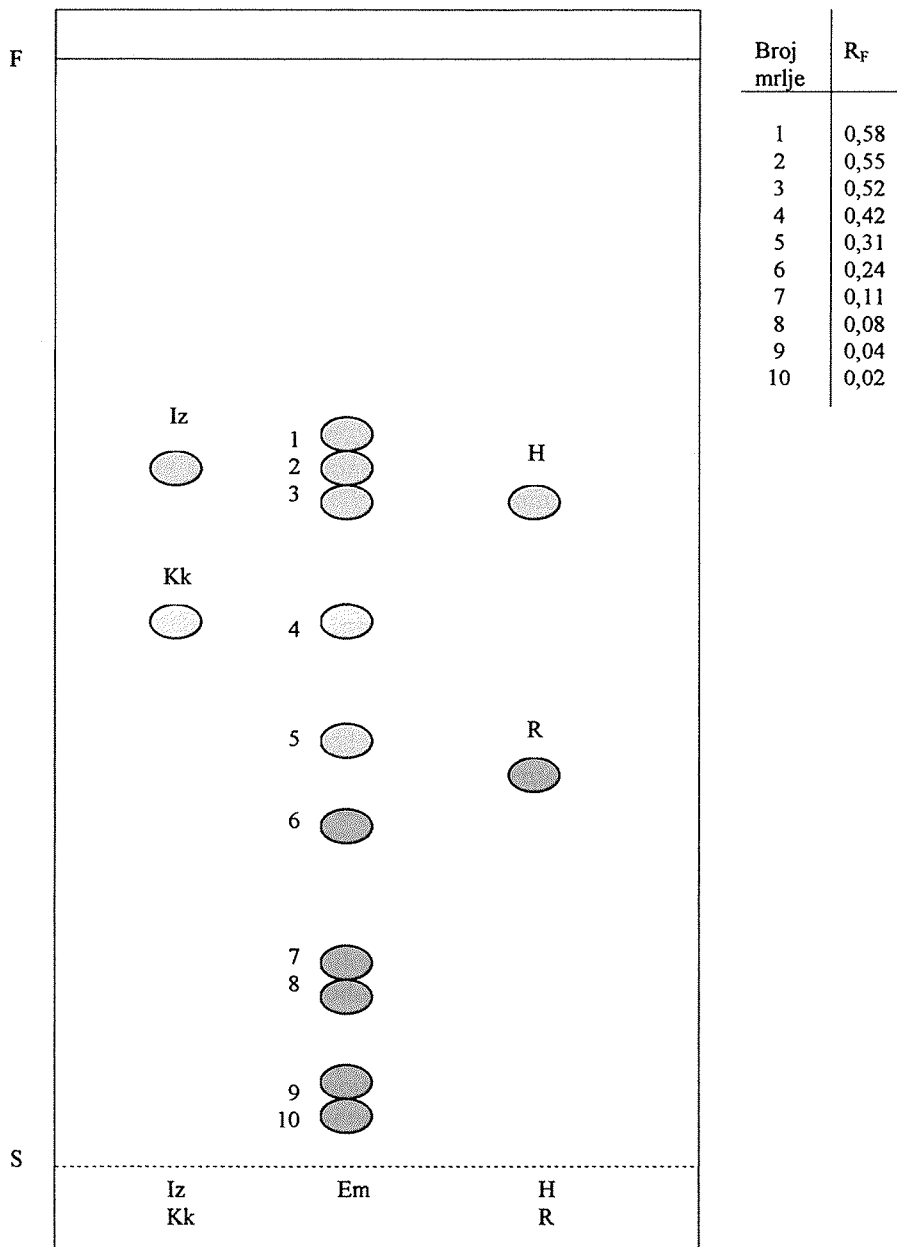
Odjeljivanje etilacetatnog ekstrakta listova (Ee) dobivenog hidrolizom provedeno je uz uporabu mobilne faze toluen-etilformijat-mravlja kiselina (5:4:1 V/V/V). Pritom je dobiveno 5 mrlja (Slika 4.). Dvije mrlje – 2 i 5 bile su narančaste fluorescencije. Mrlja 2 ($R_F = 0,52$) odgovarala je prema fluorescenciji i R_F vrijednosti poredbenoj supstanciji kvercetinu. Mrlja 1 ($R_F = 0,61$) zelenožute fluorescencije odgovarala je poredbenoj supstanciji kemferolu, dok bi mrlje 3 i 4 plave fluorescencije mogle predstavljati fenolne kiseline.

2. Kvantitativna analiza flavonoida

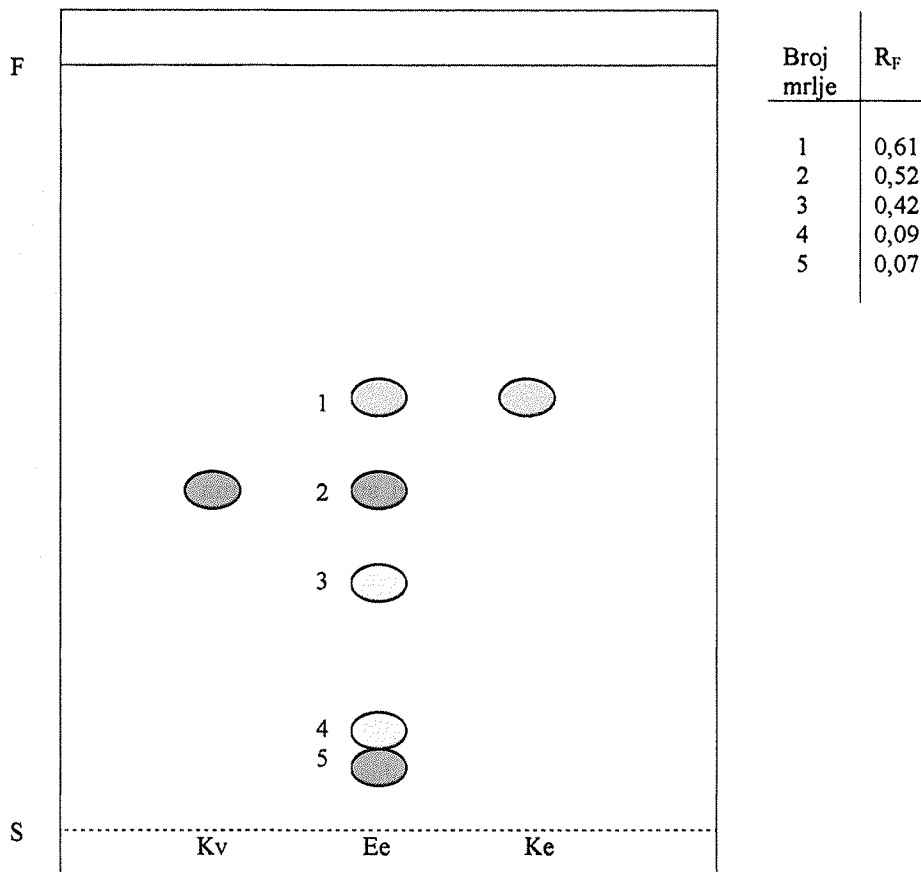
Kvantitativna analiza flavonoida provedena metodom prema Christu i Mülleru, pokazala je da listovi krškog kukurijeka sadrže $0,51 \pm 0,03\%$ flavonoida ($n = 3$).



Slika 2. Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina krškog kukurijeka
 Stacionarna faza: Kiesegel 60 F₂₅₄
 Mobilna faza: etilacetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda
 (100:11:11:27 V/V/V/V)
 Detekcija: NST/PEG (UV-365 nm)
 Iz = izokvercitrin, Kk = klorogenska kiselina, Em = metanolni ekstrakt
 listova, H = hiperozid, R = rutin



Slika 3. Kromatogram flavonoida i fenolnih kiselina krškog kukurijeka
 Stacionarna faza: Kiesegel 60 F₂₅₄
 Mobilna faza: etilacetat-mravljja kiselina-voda (8:1:1 V/V/V)
 Detekcija: NST/PEG (UV-365 nm)
 Iz = izokvercitrin, Kk = klorogenska kiselina, Em = metanolni ekstrakt listova, H = hiperozid, R = rutin



Slika 4. Kromatogram flavonoida i srodnih sastavnica krškog kukurijeka
Stacionarna faza: Kiesegel 60 F₂₅₄
Mobilna faza: toluen-etilenformijat-mravlja kiselina (5:4:1 V/V/V)
Detekcija: NST/PEG (UV-365 nm)
Kv = kvercetin, Ee = etilacetatni ekstrakt listova, Ke = kemferol

4. Kvalitativna analiza trjeslovina

Dokazivanje trjeslovina provedeno je u vodenom ekstraktu listova krškog kukurijeka.

Dodatkom otopina soli željeza došlo je do stvaranja zelenoplavog taloga.

Reakcija s olovo-subacetatom rezultirala je žućkastim talogom.

Ekstrakt je s otopinom želatine stvorio svijetložuto zamućenje.

Reakcija s formaldehidom i kloridnom kiselinom pomoću koje bi se mogle istaložiti katehinske trjeslovine dala je negativan rezultat. U filtratu su do-

kazane pirogalolske trjeslovine reakcijom s natrij-acetatom i željezo(III)-amonij-sulfatom, pri čemu je nastao ljubičastoplavi prsten.

Reakcija s vanilinom i koncentriranom kloridnom kiselinom dala je negativan rezultat; dakle u ekstraktu nisu nazočne katehinske trjeslovine.

5. Kvantitativna analiza trjeslovina

Određivanje količine ukupnih polifenola i trjeslovina provedeno je spektrofotometrijskom metodom prema Schneideru. Utvrđeno je da listovi krškog kukurijeka sadrže $4,83 \pm 0,06\%$ ukupnih polifenola te $2,35 \pm 0,05\%$ trjeslovina ($n = 3$).

ZAKLJUČAK

Metodom tankoslojne kromatografije dokazano je da listovi krškog kukurijeka – *Helleborus multifidus* Vis. subsp. *multifidus* sadrže flavonoide i fenolne kiseline. Usporedbom s poredbenim supstancijama u ekstraktu listova dokazani su izokvercitrin, hiperozid i klorogenska kiselina.

Reakcijama stvaranja obojenih produkata i taloga dokazana je nazočnost pirogalolskih trjeslovina.

Rezultati kvantitativne analize pokazali su da listovi ispitivane vrste sadrže $0,51\%$ flavonoida, $4,83\%$ ukupnih polifenola i $2,35\%$ trjeslovina.

Literatura – References

1. R. F. Thorne, Bot. Rev. **58** (1992) 258, 260.
2. Z. Martinis, rod *Helleborus*. In: Analitička flora Jugoslavije I(2): 239 (red. S. Horvatić, I. Trinajstić), Institut za botaniku Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb 1973.
3. Z. Martinis, Ž. Lovašen-Eberhardt, Acta Bot. Croat. **32** (1973) 49.
4. Č. Šilić, Endemične biljke, 2. izd., Svjetlost, Sarajevo 1988, 36.
5. T. G. Tutin, N. A. Burges, A. O. Chater, J. R. Edmondson, V. H. Heywood, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb Eds., Flora Europaea, Volume 1, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge 1993, 250.
6. H. Merxmüller, D. Podlech, Feddes Repert. **64** (1961) 1.
7. A. Degen, Flora Velebitica, II. Band, Verlag der Ungar. Akademie der Wissenschaften, Budapest 1937, 115.
8. H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski, Drogenanalyse, Springer Verlag, Berlin 1983, 163.
9. B. Christ, K. H. Müller, Arch. Pharm. **293** (1960) 1033.
10. M. Luckner, O. Bessler, R. Luckner, Pharmazie **20** (1965) 681.
11. E. Stahl, Dünnschicht Chromatographie, Springer Verlag, Berlin 1967, 655.
12. M. Luckner, Prüfung von Drogen, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1966, 225.
13. Ž. Maleš, I. Trojanović, Farm. Glas. **55** (1999) 171.
14. Ž. Maleš, M. Plazibat, Farm. Glas. **55** (1999) 265.
15. Ž. Maleš, M. Plazibat, Farm. Glas. **56** (2000) 109.
16. G. Schneider, Arch. Pharm. **309** (1976) 38.

Primljeno 28. IX. 2000.