

Fitokemijska karakterizacija polifenola endemične vrste *Centaurea ragusina* L. (Asteraceae) Phytochemical characterization of polyphenols from endemic species *Centaurea ragusina* L. (Asteraceae)

Uvod i cilj

Suvremena fitoterapija, koja uključuje primjenu standardiziranih biljnih lijekova (fitoterapeutika), sa strogo definiranim sadržajem i sastavom terapijski aktivnih tvari, opet pobuđuje interes svih slojeva društva te postaje sve popularnija diljem svijeta. Povećani interes za ljekovitim biljem posljedica je sve većeg broja bolesti od kojih za mnoge nema lijekova. Brojne od tih bolesti proizlaze iz nezdrave prehrane i uzbunog načina života pa se povratak čovjeka prirodi čini logičnim.

U okviru ovoga rada provedena je fitokemijska karakterizacija hrvatske endemične vrste *Centaurea ragusina* L. (dubrovačka zečina, porodica Asteraceae) sa srednjodalmatinskog otoka Brusnika. S namjerom istraživanja njezina ljekovitog potencijala, provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza polifenolnih tvari. Dobiveni rezultati predstavljaju polazište za daljnja istraživanja farmakološke vrijednosti spomenute biljne vrste i otvaraju mogućnosti prepoznavanja potencijalno djelotvornih tvari u fitoterapiji.



Dubrovačka zečina (*Centaurea ragusina* L.)

Dubrovačka zečina je endemska vrsta, zaštićena od 1969. godine na svim svojim staništima. Prvi je put znanstveno opisana krajem 17. stoljeća, kada je francuski botaničar Joseph Pitton de Tournefort, na svojoj ekspediciji po Sredozemlju, skupio biljku u okolici Cavtata i nazvao je „*Jacea epidaurica candidissima tomentosus*“, što bi u prijevodu s latinskog bilo „bijela dlakava zečina iz Cavtata“. Epidaurus je antički naziv za Cavtat, koji je tijekom srednjeg vijeka nazvan Ragusa Vecchia, pa je zato nova biljna vrsta dobila naziv *Centaurea ragusina* – dubrovačka zečina, iako ona ne raste u samom Dubrovniku i njegovoj užoj okolici (www.opcinakonavle.hr).

Dubrovačka zečina raste u pukotinama karbonatnih stijena koje se okomito izdižu iznad mora, ali i na eruptivna otočja Brusnika. Hazmofitska je, heliofilna i halofitska vrsta. Raste na brdu Marjan kod Splita, otocima Solta, Čiova, Hvaru, Sv. Andriji, Brusniku, Biševu, Visu, Suću, Palagruži, Mljetu, poluotoku Pelješcu te u okolici Cavtata. Višegodišnja je bijelo pustenasta biljka. Stabljike su joj uspravne ili pridignute, jednostavne, uglatne, 30-60 cm visoke, pri vrhu s 1-3 (-4) cvatne glavice, pri dnu odvojene i bijelo vunašte. Bazalni su listovi na dugoj peteljci, brojni su, perasto razdijeljeni, sa svake strane s (4-) 5-7 (-8) odbojčaka. Glavice su okruglate, promjera 20-25 mm. Ovojne su luskave bijeloduljene do bijelo pustenaste, pri vrhu sa smeđecrnom, trokutastim, željasto-žutkastim priveskom, koji završava vršicom, oko 4 mm dugim trnom svitnutim prema natrag. Roška je 4-5 mm duga i oko 1,5 mm široka. Valjkasta je, pri dnu blago sužena, sivkasta, prekrivena poleglim, blago stršćim, svilenkastim dlacicama. Kunadra je iste dužine kao i roška, sastavljena od bijelih stršćih i ukocanih dlaka (Šilić, 1990).

Materijali i metode

Biljni materijal

Biljni materijal je prikupljen tijekom lipnja 2012. godine na otoku Brusniku. Identifikacija biljnog materijala provedena je u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, prema dostupnim literaturnim podacima (Šilić, 1990). Analizirani su pulverizirani nadzemni dijelovi dubrovačke zečine.



Ekperimentalni dio

Provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza biološki aktivnih polifenolnih spojeva u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine. Trjeslovine koje hidroliziraju i kondenzirane trjeslovine ispitane su općim reakcijama s metalnim solima i želatinskom, dok je kvalitativna analiza flavonoida provedena metodom tankoslojne kromatografije. Sadržaj polifenolnih spojeva dubrovačke zečine (ukupnih polifenola, trjeslovinna, flavonoida i fenolnih kiselina) određeni su spektrofotometrijskim metodama.

Kvantitativna analiza ukupnih polifenola i trjeslovinna	
Izvagano je 0,25 g praškastog biljnog materijala.	
Biljni materijal ekstrahirano je s 80 mL 30% metanolom (70 °C, vodena kupelj, 15 min).	
Nakon hlađenja i filtracije ekstrakti su dopunjeni do 100,0 mL s 30% metanolom (osnovna otopina).	
2 mL osnovne otopine pomiješano je s 8 mL vode i 10 mL acetatnog pufera (otopina 1, O1).	
10 mL O1 mučkanu je s 50 mg kazeina 45 min (adsorpcija trjeslovinna) i filtrirano (otopina 2, O2).	
1 mL O1 pomiješan je s 0,5 mL Folin-Ciocalteuova reagensa (FCR) i dopunjen do 10,0 mL s 33% Na ₂ CO ₃ , 10 H ₂ O, isti je postupak ponovljen s O2.	
Nakon filtracije, izmjerene su apsorbancije plavili otopina na 720 nm, uz vodu kao slijepi uzorak.	

Kvantitativna analiza flavonoida	
Izvagano je 0,20 g praškastog biljnog materijala.	
Biljni je materijal ekstrahirano s 20 mL acetona, 2 mL 25%-ne klorovodične kiseline i 1 mL 0,5%-tne otopine heksametilentetramina (vrela vodena kupelj, 30 min).	
Hidrolizat je propušten kroz vatu, a ostaci droge ponovo su ekstrahirani 3 puta po 10 min s 20 mL acetona; sjedinjeni filtrati dopunjeni su acetonom do 100,0 mL.	
20 mL hidrolizata pomiješano je s 20 mL vode i ekstrahirano u lijevku za odjeljivanje (prvo s 15 mL, te potom tri puta po 10 mL etil acetata).	
Sjedinjene etil acetatne faze isprane su dva puta s po 40 mL vode, propuštene kroz vatu i nadopunjene etil acetatom do 50,0 mL (osnovna otopina, E1).	
Po 10 mL E1 preneseno je u dvije odmjerne tikvice od 25 mL. U obje tikvice dodano je po 0,5 mL 0,5%-tne otopine natrijeva citrata, a u jednu još i 2 mL otopine aluminijeva klorida.	
Objee su tikvice dopunjene do 25,0 mL s 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline i nakon 45 min izmjerene su apsorbancije žutih otopina na 425 nm, uz slijepi uzorak (otopine bez AlCl ₃).	

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina	
Izvagano je 0,20 g praškastog biljnog materijala.	
Nakon hlađenja, ekstrakt se filtrirao u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se potom nadopuni do oznake 50%-tnim etanolom.	
1,0 mL dobivenog ekstrakta prenese se u odmjernu tikvicu od 10 mL.	
Dodaje se: 2,0 mL 0,5 M HCl, zatim 2,0 mL nitrit-molibdat reagensa (10 g NaNO ₂ i 10 g Na ₂ MoO ₄ otopi se u 100 mL dest. H ₂ O) te 2,0 mL 8,5%-tne otop. NaOH.	
Sadržaj tikvice nadopuni se destiliranom vodom do 10,0 mL.	
Kompencirajuća otopina.	1,0 mL ekstrakta razrijedi se destiliranom vodom u odmjernu tikvicu od 10 mL.
Apsorbancije otopina izmjere se na 505 nm.	

Rezultati i rasprava

Kvalitativna analiza polifenolnih tvari

Potvrđena je prisutnost polifenola i trjeslovinna u ispitanim biljnim ekstraktima primjenom kemijskih reakcija stvaranja obojenih produkata i taloga. Reakcijom s natrijevim acetatom i željezovim(III) amonijevim sulfatom dokazane su trjeslovine koje hidroliziraju. Također je ispitana prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina primjenom tankoslojne kromatografije, a na temelju R_f vrijednosti i boje detektiranih kromatografskih zona može se ustvrditi da metanolni ekstrakt dubrovačke zečine sadrži kvercetin, rutin i klorogensku kiselinu.

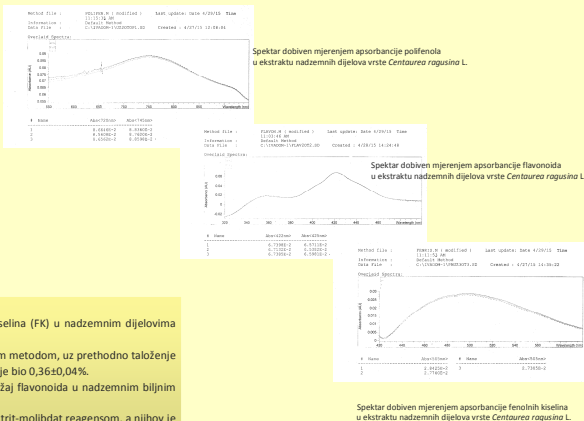
Tablica 1. Sadržaj polifenolnih tvari u ekstraktima nadzemnih dijelova vrste *Centaurea ragusina* L.

<i>Centaurea ragusina</i> L.					
	Sadržaj UP ($\bar{x} \pm SD, n=3$)	Sadržaj T ($\bar{x} \pm SD, n=3$)	Sadržaj F ($\bar{x} \pm SD, n=3$)	Sadržaj FK ($\bar{x} \pm SD, n=3$)	
ekstrakt 1	uzorak 1	2,84 ± 0,05	0,35 ± 0,07	0,24 ± 0,00	0,39 ± 0,01
	uzorak 2	2,91 ± 0,06	0,31 ± 0,06	0,26 ± 0,00	0,36 ± 0,00
ekstrakt 2	uzorak 1	2,93 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,26 ± 0,00	0,37 ± 0,01
	uzorak 2	3,47 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,25 ± 0,00	0,38 ± 0,02

Legenda: U - ukupni polifenoli; T - trjeslovine; F - flavonoidi; FK - fenolne kiseline

Kvantitativna analiza polifenolnih tvari

Rezultate spektrofotometrijskog određivanja ukupnih polifenola (UP), trjeslovinna (T), flavonoida (F) i fenolnih kiselina (FK) u nadzemnim dijelovima dubrovačke zečine donosi Tablica 1. Količina ukupnih polifenola i trjeslovinna u ekstraktima dubrovačke zečine određena je FCR spektrofotometrijskom metodom, uz prethodno taloženje trjeslovinna s kazeinom. Sadržaj ukupnih polifenola u analiziranim uzorcima iznosio je 3,04±0,04%, a udio trjeslovinna je bio 0,36±0,04%. Kvantitativna analiza flavonoida dubrovačke zečine provedena je spektrofotometrijskom metodom s AlCl₃, a sadržaj flavonoida u nadzemnim biljnim dijelovima je iznosio 0,25±0,00%. Fenolne kiseline u uzorcima dubrovačke zečine određene su spektrofotometrijski prema Europskoj farmakopeji s nitrit-molibdat reagensom, a njihov je sadržaj iznosio 0,38±0,01%.



Sažetak / Abstract

Uzgoj ljekovitih biljaka na slabo naseljenim jadranskim otocima mogao bi biti jedan od pokretača njihovog gospodarskog i socijalnog razvoja. U tu se svrhu intenziviraju znanstvena istraživanja potencijalno ljekovitih biljnih vrsta koje tamo uspijevaju. U okviru ovoga rada provedena je fitokemijska karakterizacija hrvatske endemične vrste *Centaurea ragusina* L. (dubrovačka zečina, porodica Asteraceae) sa srednjodalmatinskog otoka Brusnika. Prisutnost polifenolnih tvari dokazana je općim reakcijama stvaranja obojenih produkata ili taloga. Provedbom tankoslojne kromatografije potvrđena je prisutnost kvercetina, rutina i klorogenske kiseline u metanolnom ekstraktu dubrovačke zečine. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola (UP), trjeslovinna (T), flavonoida (F) i fenolnih kiselina (FK) provedena je spektrofotometrijskim metodama. Sadržaj analiziranih polifenolnih tvari iznosio je: 3,04±0,04% (UP), 0,36±0,04% (T), 0,25±0,00% (F) i 0,38±0,01% (FK). Provedena fitokemijska karakterizacija predstavlja prilog znanstvenom istraživanju hrvatskih endema i potupunjuje dosadašnje znanstvene spoznaje fitoterapijskog potencijala dubrovačke zečine, posebice u odnosu na sadržaj bioaktivnih polifenolnih tvari.



Cultivation of medicinal plants on sparsely populated Adriatic islands is one potential initiator of their economic and social development. In order to help to choose the potential herbal species for cultivation, the scientific investigations of plants growing in Mediterranean areas are carried out with enhanced intensity. In this work, phytochemical characterization of a Croatian endemic species *Centaurea ragusina* L. (Asteraceae) was conducted. The presence of polyphenols was proven by using general reactions of developing colored products and precipitates. The thin layer chromatography revealed the presence of quercetin, rutin, and chlorogenic acid in the methanolic extract. Quantitative analysis of total polyphenols (TP), tannins (T), flavonoids (F), and phenolic acids (PA) was carried out using the spectrophotometric methods. The contents of analyzed polyphenolic compounds were as follows: 3.04±0.04% (TP), 0.36±0.04% (T), 0.25±0.00% (F), and 0.38±0.01% (PA). Conducted phytochemical characterization is a contribution to the scientific study of Croatian endemic species and completes the existing knowledge about phytotherapeutic potential of *C. ragusina*, especially in relation to the content of bioactive polyphenolic substances.

Literatura

- Christ B, Müller KH. *Arch Pharm*, 1960, 293, 1033-1042.
- European Pharmacopoeia, Sixth Edition, Vol. 2, Strasbourg, Council of Europe, 2007.
- Grdinc V, Kremer D. Ljekovito bilje ljekovite droge: farmakoterapijski, botanički i farmaceutski podaci. Zagreb, Hrvatska ljekarička komora, 2009.
- Okuda T, Ito H. *Molecules*, 2011, 16, 2191-2217.
- Rastija V, Medić-Saric M. *Chem Ind*, 2009, 58, 121-128.
- Schneider G. *Arch Pharm*, 1976, 309, 38-44.
- Šilic Č. *Endemične biljke*. Sarajevo, Svjetlost, 1990.

