

Vrste *Elymus repens* (L.) Gould i *Cynodon dactylon* (L.) Pers. - prilog fitokemijskom istraživanju

Stanić, Gordana; Gavrić, Dario; Šimić, Ivana

Source / Izvornik: *Farmaceutski glasnik*, 2000, 56, 1 - 9

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:668056>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Vrste *Elymus repens* (L.) Gould i *Cynodon dactylon* (L.) Pers. – prilog fitokemijskom istraživanju

GORDANA STANIĆ, DARIO GAVRIĆ, IVANA ŠIMIĆ

Zavod za farmakognoziju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Phytochemical study of *Elymus repens* Gould and *Cynodon dactylon* (L.) Pers.

S u m m a r y – Comparative TLC analysis of flavonoid constituents of *Elymus repens* (L.) and *Cynodon dactylon* (L.) Pers. enable reliable identification and differentiation of their overground and underground plant part. On the other hand, a chromatogram obtained with chloroform-methanol-water 64:50:10 as a »screening« solvent system was less specific for particular drugs. Further TLC analysis revealed that both species contained sterol fraction related to β -sitosterol. In addition, hydrolyzed extract of *E. repens* showed the presence of quercetin and luteolin as the aglycons of flavonoid glycosides. Contemporary, glycosidic bound sterol constituent was not evidenced. Using two dimensional TLC, free and glycosidic bound fructose was detected in the overground and underground part of *E. repens*.

(Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 1000 Zagreb, Croatia)

UVOD

Za brojne indikacije pri kojima se primjenjuje podanak pirike (*Rhizoma graminis*; *Elymus repens*, *Poaceae*)-cistitis, uretritis, prostatitis, hipertrofija prostate, urolitijaza, giht, reumatske bolesti, kronične kožne bolesti – još uvijek nema racionalne utemeljenosti u farmakološkim, a kamoli u kliničkim ispitivanjima (1,2). Ipak, iskustva pučke medicine ne mogu se zanemariti; ona su i ovdje poticaj i putokaz istraživanju djelatnih sastavnica i biološke aktivnosti.

God. 1971. objavljeni su rezultati rada kojim su *Racz-Kotilla* i *Mozes* (3) dokazali diuretski i saluretični učinak vodenog i vodeno-etanolnog pripravka droge *Rhizoma graminis*.

U radu objavljenom 1995. god. *Grases* i suradnici (4) izvješćuju o ispitivanju utjecaja vrsta *Herniaria hirsuta* i *Agropyron repens* (sinonim za *E. repens*) na urolitijazu kod štakora. Pokazalo se da, za razliku od vrste *H. hirsuta*, vrsta *A. repens* utječe značajnije na faktore rizika pri nastanku oksalatnih kamenaca.

U kemijskom pogledu drogu *Rhizoma graminis* karakterizira sadržaj fruktana, osobito triticina (3–18%), slobodne fruktoze, sluzi, šećernih alkohola manita i inozita (2–3%) te eteričnog ulja (0.01–0.05%) (1). Za nadzemni dio

vrste *E. repens* u stadiju cvatnje (droga Flos graminis), navode se od djelatnih tvari samo općenito rašireni spojevi kao što su flavonoidi, tanini, fenolne kiseline, proteini i šećeri.

Iz 1985. datiraju podaci o otkriću lektina (5) te fitosterola (6) u listovima pirike. Noviji literaturni podaci odnose se na izolaciju i određivanje strukture alkilnih estera p-hidroksicimetne kiseline (7). Zanimljivo je i istraživanje fitotoksina u izdancima i korijenju vrste *A. repens*. Friebe i suradnici (8) dokazali su prisutnost cikličkih hidroksamskih kiselina 2,4-dihidroksi-7-metoksi-2H-1,4-benzoksazin-3-ona (DIMBOA) i 2,4-dihidroksi-2H-1,4-benzoksazin-3-ona (DIBOA), te vanilinske, ferulne i β -hidroksimaslačne kiseline.

Podanak zubače (Rhizoma graminis italici; *Cynodon dactylon*, Poaceae) u farmakognoškoj se literaturi spominje poglavito kao patvorina droge Rhizoma graminis. Noviji literaturni podaci (9,10) odnose se na istraživanje alergena (BG 60 i Cyn d1) u polenu te vrste. Istražujući droge koje se u Meksiku primjenjuju kao »antidiabetici«, skupina autora (11) dokazala je da neke vrste, među kojima i *C. dactylon*, pokazuju znakovit hipoglikemični učinak.

Kad se radi o drogama blagog učinka kod kojih nije poznata specifična djelatna tvar, odnosno skupina djelatnih tvari, a nisu niti dokazani specifični učinci, nameće se pitanje po čemu se oficinalna droga razlikuje od one koja se smatra patvorinom. U prethodnom radu (12) objavili smo pregled botaničkih obilježja kao i podataka o kemijskom sastavu i djelovanju vrsta *E. repens* i *C. dactylon*. U literaturi se kao razlikovno kemijsko obilježje navodi prisutnost inulina u podanku vrste *E. repens* te škroba u podanku vrste *C. dactylon*, što se lako dokazuje histokemijskim reakcijama.

Radi upoznavanja kemijskog sastava, odnosno kemijske karakterizacije vrsta *E. repens* i *C. dactylon*, obavili smo komparativna kromatografska ispitivanja sastavnica njihovih podzemnih i nadzemnih dijelova. Dobiveni podaci mogu poslužiti kao kemotaksonomske odrednice pri ispitivanju identiteta navedenih droga i njihovih pripravaka.

EKSPERIMENTALNI DIO

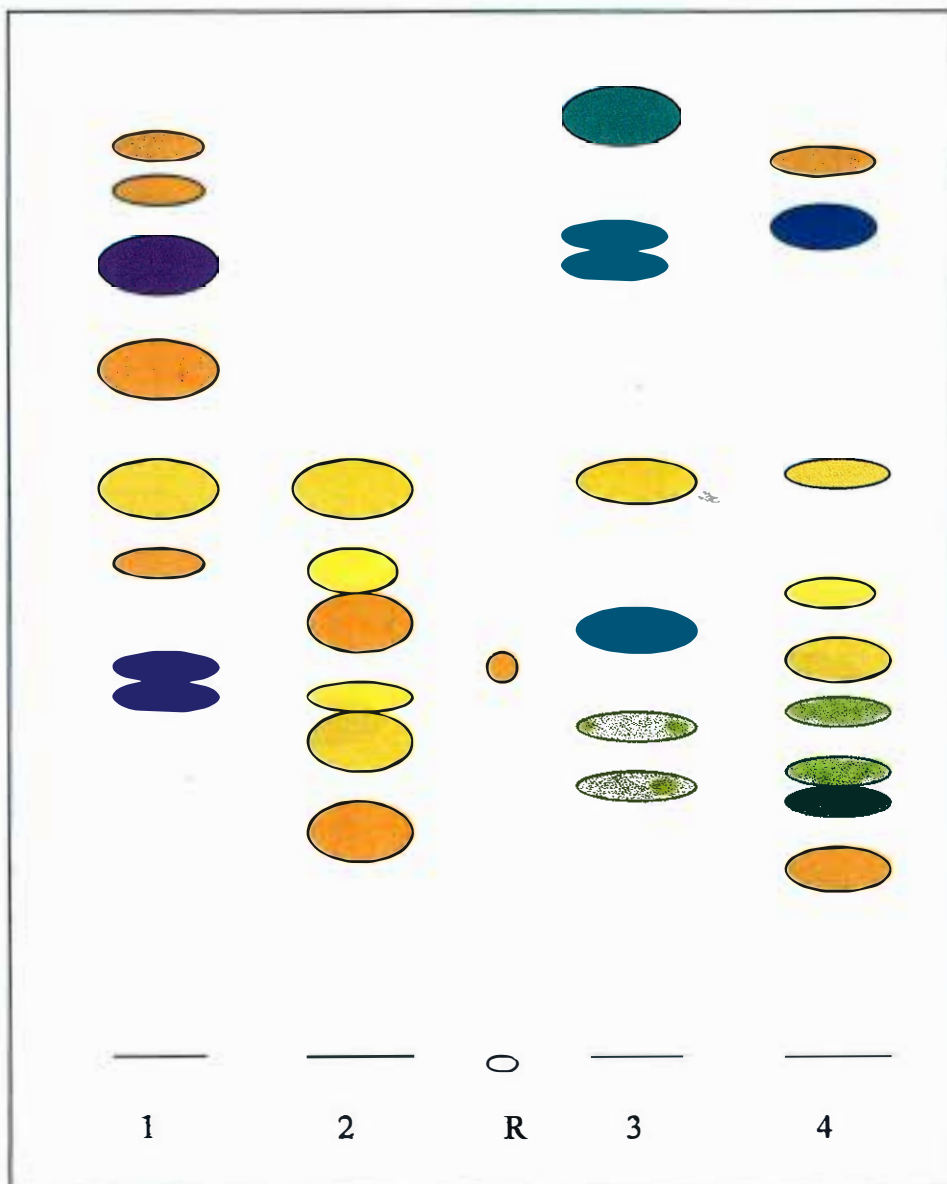
1. Biljni materijal

Nadzemni i podzemni dijelovi pirike, *Elymus repens* (L.) Gould (sin. *Agropyron repens*, Poaceae) skupljeni su u Botaničkom vrtu »Fran Kušan« Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Biljni dijelovi vrste *Cynodon dactylon* (L.) Pers. potječu iz okolice Vinkovaca.

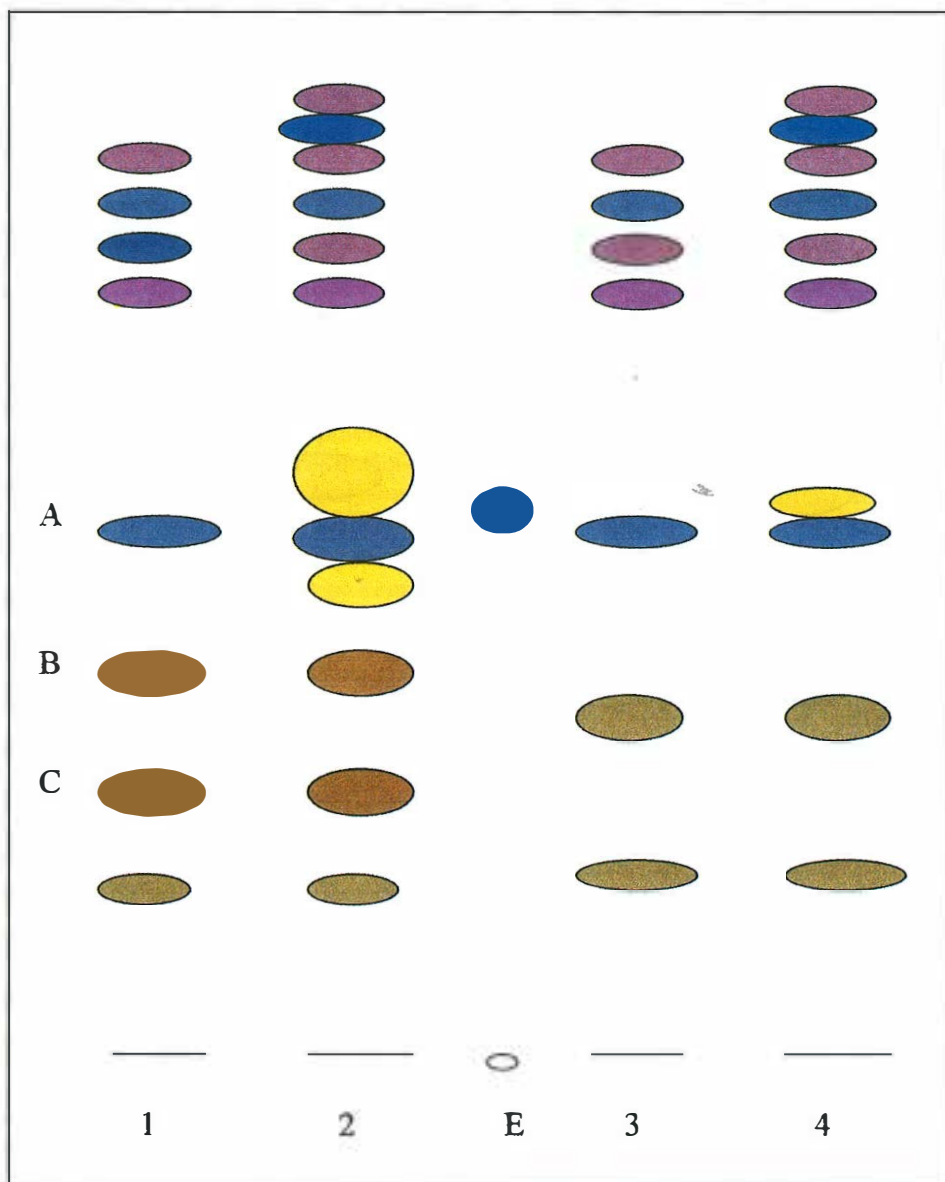
2. Ispitivanja vrsta *Elymus repens* i *Cynodon dactylon*

2.1. Priprava metanolnog ekstrakta droge

1 g droge u prašku zagrijavano je 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo s 10 ml metanola. Metanolni ekstrakt je nakon filtriranja uparen na rotacijskom vakuum-uparivaču, a ostatak otopljen u 1 ml metanola.



Slika 1. Kromatogram flavonoida i srodnih sastavnica vrsta *E. repens* i *C. dactylon* dobiven primjenom razvijaača etilacetat-mravljja kiselina-octena kiselina-voda 100:11:11:27. Detekcija: NST/PEG (UV-365 nm). R=rutin. 1,2,3,4 vidi u Tablici 1.



Slika 2. Kromatogram sastavnica vrsta *E. repens* i *C. dactylon* dobiven primjenom razvijanja kloroform-metanol-voda 64:50:10. Detekcija: klorsulfonska kiselina
E=escin. 1,2,3,4, kao u Tablici 1.

Tablica 1

Rf vrijednosti i boja fluorescencije supstancija prikazanih na kromatogramu metanolnih ekstrakata vrsta *E. repens* i *C. dactylon* (Slika 1)

1	2	3	4	Boja fluorescencije
<i>E. repens</i> - podzemni dio	<i>E. repens</i> - nadzemni dio	<i>C. dactylon</i> - podzemni dio	<i>C. dactylon</i> - nadzemni dio	
	0.22 +++		0.20 ++	narančasta
			0.24 +	narančasta
		0.26 +		zelena
	0.30 +++		0.28 +	žutozelena
		0.32 +		žutonarančasta
	0.36 ++		0.34 +	žutozelena
0.38 +				žuta
			0.40 ++	plava
0.42 +		0.44 ++		žutonarančasta
	0.46 +++			plavoljubičasta
	0.50 ++		0.48 +	zelena
0.52 +				narančasta
0.58 +++	0.58 +++	0.58 ++	0.58 +	žutonarančasta
0.69 +++				narančasta
		0.73 +		plavozelena
0.77 +++				plavoljubičasta
		0.80 +		plavozelena
0.85 +			0.82 ++	plava
0.90 +			0.90 +	narančasta
		0.93 +++		narančasta
				zelena

+, ++, +++ oznake relativnog udjela komponenata

2.1.1. Ispitivanje nazočnosti flavonoidnih heterozida

Na gotove staklene ploče sa slojem silikagela (Kieselgel 60 F₂₅₄, 0.25 mm; Merck, Darmstadt) nanose se metanolni ekstrakti droga i poredbena otopina rutina. Za odjeljivanje supstancija rabljen je razvijач etilacetat-mravlja kiselina-octena kiselina-voda 100:11:11:27 (13). Radi detekcije supstancija ploča se prska reagensima NST i PEG, a nakon toga se promatra u UV zračenju od 366 nm.

2.1.2. Ispitivanje nazočnosti β -sitosterola

Za odjeljivanje fitosterola primijenjene su gotove ploče sa silikagelom, razvijajući benzen-aceton 9:1, klorosulfonska kiselina kao reagens za detekciju te otopina β -sitosterola za usporedbu sa sastavnicama ekstrakata droga.

2.1.3. Ispitivanje nazočnosti saponina

Metanolni ekstrakti droga odjeljivani su na gotovim pločama sa silikagelom pomoću razvijajućeg kloroform-metanol-voda 64:50:10 (13). Na ploču je za poredbu nanijeta metanolna otopina escina. Supstancije su detektirane nakon prskanja ploče klorosulfonskom kiselinom i zagrijavanja u termostatu na 105 °C.

3. Ostala ispitivanja vrste *Elymus repens*

3.1. Priprava hidroliziranih ekstrakata

2 g droge u prašku zagrijavano je 30 minuta s 20 ml petroletera na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Petroleterna iscrpina je profiltrirana, a droga je s filterpapira sastrugana u okruglu tikvicu s 20 ml 10%-tne kloridne kiseline. Nakon dvosatnog zagrijavanja na vodenoj kupelji, hidrolizat je profiltriran, a filtrat je u lijevku za odjeljivanje izmuckan etilacetatom. Etilacetatni ekstrakt uparen je na rotacijskom vakuum-uparivaču, a ostatak otopljen u 1 ml etilacetata.

3.1.1. Ispitivanje nazočnosti flavonoidnih aglikona nakon hidrolize

a) Na gotove ploče sa silikagelom nanijeti su etilacetatni ekstrakti hidrolizata droga te poredbene otopine standardnih flavonoida – apigenina, kemferola, kvercetina i luteolina. Ploča je razvijana sustavom otapala toluen-etilformijat-mravlja kiselina 5:4:1 (14).

b) Odjeljivanje etilacetatnih ekstrakata na gotovim pločama s poliamidom (Polyamid 11 F₂₅₄; 0.15 mm; Merck, Darmstadt) obavljeno je razvijajućem metanol-metiletiketon-acetilaceton 10:5:1 (15).

Flavonoidni aglikoni detektirani su na isti način kao flavonoidni heterozidi. (2.1.1.)

3.1.2. Ispitivanje nazočnosti glikozidno vezanog β -sitosterola

Etilacetatni ekstrakti dobiveni nakon hidrolize droga, odjeljivani su na pločama sa silikagelom smjesom otapala benzen-aceton 9:1, uz poredbenu otopinu β -sitosterola. Detekcija sterola obavljena je na opisan način. (2.1.2.)

3.2. Ispitivanje nazočnosti slobodne i glikozidno vezane fruktoze

Za dvodimenzionalnu kromatografiju primijenjene su gotove staklene ploče sa silikagelom 20 × 20 cm. Odjeljivanje metanolnog ekstrakta droga u prvom je smjeru obavljeno primjenom razvijajućeg kloroform-metanol-voda 64:50:10 (12). Osušena ploča prskana je otopinom 10%-tne kloridne kiseline i termostatirana 30 minuta na 110 °C. Potom je u drugom smjeru odjeljivanje

provedeno razvijanjem kloroform-metanol-voda 64:36:8 (16) uz poredbenu otopinu fruktoze. Reagens timol/sulfatna kiselina primijenjen je za otkrivanje supstancija.

RASPRAVA REZULTATA

Na Slici 1. prikazan je karakteristični kromatogram metanolnih ekstrakata ispitivanih droga dobiven primjenom razvijача etilacetat-mravljja kiselina-octena kiselina-voda 100:11:11:27. Na kromatogramu podzemnog dijela pirike (*E. repens*) ističu se komponente narančaste i plave, odnosno plavljubičaste fluorescencije. Među njima dominiraju tri komponente Rf vrijednosti 0.58, 0.69 i 0.77. Narančasta boja fluorescencije karakterizira flavonoidne heterozide s luteolinom i kvercetinom kao aglikonskim komponentama, dok plava fluorescencija pripada fenolnim kiselinama i kumarinima. Na kromatogramu nadzemnog dijela pirike vidljive su narančaste i žute mrlje flavonoidnih heterozida u Rf području od 0.22 do 0.58. Niti jedna ne odgovara rutinu kao poredbenoj supstanciji. Supstancije Rf vrijednosti 0.22 i 0.30 vjerojatno pripadaju flavonoidnim heterozidima s tri šećerna ostatka. Osim njih ističu se komponente Rf vrijednosti 0.46 i 0.58 u području diglikozida i monoglikozida. Ako se usporede kromatogrami podzemnog i nadzemnog dijela pirike, dolazi se do zaključka da je nadzemni dio bogatiji sadržajem flavonoidnih spojeva, što je i razumljivo, jer se flavonoidi u znatno većoj mjeri nakupljaju u nadzemnim, zelenim dijelovima biljaka.

Na kromatogramu podzemnog dijela vrste *C. dactylon* prevladavaju zone zelene, žutozelene i plavozelene fluorescencije. Zelene i žutozelene zone vjerojatno potječu od glikozida s kemferolom kao aglikonskom komponentom. Kromatogram ekstrakta nadzemnog dijela biljke također pokazuje raznolikost flavonoidnog sastava.

Kad se usporede sva četiri kromatograma, tj. broj, intenzitet fluorescencije i širina zona, može se reći da su nadzemni dijelovi obiju vrsta bogatiji flavonoidnim spojevima dok podzemni dijelovi pokazuju u većoj mjeri prisutnost drugih polifenolnih spojeva. Očevidno je da kromatografske slike ispitivanih ekstrakata mogu poslužiti pri identifikaciji vrsta *E. repens* i *C. dactylon*, odnosno pri ispitivanju prisutnosti patvorina.

Kako se u okviru »screening« kromatografskih ispitivanja često primjenjuje kromatografski sustav prikladan za otkrivanje saponinskih spojeva, a i zbog literaturnih naznaka o saponinima u vrsti *E. repens*, pristupilo se odjeljivanju metanolnih ekstrakata droga na pločama sa silikagelom pomoću razvijача kloroform-metanol-voda 64:50:10. Nakon obrade ploče klorosulfonskom kiselinom i zagrijavanja u termostatu, dobiven je kromatogram prikazan na Slici 2. Očevidno je da zbog nedostatne specifičnosti kromatografskih slika pojedinih droga, taj je kromatografski sustav manje prikladan za razlučbu ispitivanih droga. Neke od detektiranih supstancija, kao što je supstancija A u Rf području escina, mogle bi pripadati saponinima. Žuto obojene zone na kromatogramima nadzemnih dijelova odgovaraju flavonoidima. Za zone u

donjem dijelu kromatograma moglo se pretpostaviti da pripadaju karbohidratima ili heterozidima s duljim šećernim lancem.

Temeljem literaturnih navoda o β -sitosterolu kao jednoj od sastavnica droge *Rhizoma graminis*, pristupilo se kromatografskom ispitivanju prisutnosti fitosterola uz β -sitosterol kao poredbenu supstanciju. U ekstraktima podzemnih i nadzemnih dijelova vrsta *E. repens* i *C. dactylon* otkrivena je supstancija koja kromatografski odgovara β -sitosterolu, ali se samo na temelju tog kromatograma ne može zaključiti radi li se o čistom spoju ili o smjesi β -sitosterola, stigmasterola i ergosterola. Ne temelju veličine mrlja i intenziteta boje može se procijeniti da nadzemni dijelovi obiju vrsta sadržavaju veću količinu fitosterolne frakcije u odnosu na podzemne dijelove, te da najviše fitosterola ima u nadzemnom dijelu vrste *C. dactylon*.

Daljnja ispitivanja odnose se na piriku (*E. repens*). Da bi se pobliže ispitao flavonoidni sastav, odnosno aglikonski dio flavonoidnih heterozida, pripremljen je hidrolizirani ekstrakt podzemnog i nadzemnog dijela pirike. Etilacetatna iscrpina hidrolizata droge kromatografirana je na pločama sa silikagelom uz poredbene otopine apigenina, luteolina, kvercetina i kemferola. U Rf području kvercetina i luteolina detektirano je u hidrolizatima droga nekoliko slabo razdvojenih zona. Stoga je odjeljivanje ponovljeno na pločama s poliamidom pomoću razvijaača metanol-metiletilketon-acetilacetona 10:5:1. Tim je postupkom dokazana prisutnost luteolina (Rf 0.13) u hidrolizatu nadzemnog dijela te kvercetina (Rf 0.30) u hidrolizatu podzemnog dijela pirike. Široka zona flavonoida ispod fronte razvijaača upućivala je na glavninu nehidroliziranih heterozida. Može se pretpostaviti da se radi o tzv. C-C heterozidima koji teže podliježu hidrolizi.

Kako bi se ispitala možebitna prisutnost glikozidno vezanih fitosterola, iz droge je prije hidrolize uklonjen slobodni fitosterol ekstrakcijom pomoću petroletera. Međutim, u etilacetatnoj iscrpini hidrolizata podzemnog i nadzemnog dijela pirike nije dokazana fitosterolna frakcija oslobođena iz glikozidne veze.

Literaturni podaci o fruktozi te oligo- i polifruktozanim u podanku pirike naveli su nas da u ekstraktima podzemnog i nadzemnog dijela pirike kromatografski ispitamo prisutnost slobodne i glikozidne vezane fruktoze. Primijenjena je metoda jednodimenzionalne i dvodimenzionalne kromatografije; razvijanje u drugom smjeru obavljeno je nakon hidrolize odijeljenih supstancija na ploči. Jednodimenzionalnom kromatografijom uz primjenu razvijaača kloroform-metanol-voda 64:50:10 utvrđeno je da supstancija Rf vrijednosti 0.44 (Slika 2, supstancija B) kromatografski odgovara fruktozi. Metodom dvodimenzionalne kromatografije i hidrolize na ploči, dokazano je da druga, polarnija supstancija Rf vrijednosti 0.30 (supstancija C) hidrolizom oslobađa također fruktozu. Rezultati su bili istovjetni za podzemni i nadzemni dio pirike.

Objavljena ispitivanja prikazuju da su obje vrste, *E. repens* i *C. dactylon* zanimljiv biljni materijal za daljnja fitokemijska i farmakološka ispitivanja te ujedno upućuju na dosad nedostatan istražen fitoterapijski potencijal biljaka iz porodice trava (Poaceae).

Literatura – References

1. M. Wichtl, Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, N. G. Bisset (Ed.), Medpharm Scientific Publishers, 1994, 239– 242.
2. E. Steinegger, R. Hänsel, Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1988, 111.
3. E. Racz-Kotilla, E. Mozes, Rev. Med. 17 (1971) 82.
4. F. Grases, M. Ramis, A. Costabauza, J. G. March, J. Ethnopharm. 45 (1995) 211.
5. B. Cammue, H. M. Stinissen, W. J. Peumans, Eur. J. Biochem. 148 (1985) 315.
6. P. L. Genevivi, F. Sciaraffia, S. Mannino, Agrochimica 29 (1985) 289.
7. U. Koetter, M. Kaloga, H. Schilcher, Planta Med. 60 (1994) 488.
8. A. Friebe, M. Schulz, P. Kuck, H. Schnabl, Phytochem. 38 (1995) 1157.
9. H. Ohsuga, S. N., Su, N. Takahashi, S. Y. Yang, H. Nakagawa, I. Shimada, Y. Arata Y. C. Lee, J. Biol. Chem. 271 (1996) 26653.
10. P. M. Smith, C. Suphioglu, I. J. Griffith, K. Theriault, R. B. Knox, M. B. Singh, J. Aller, Clin. Immun. 98 (1996) 331.
11. R. Román Ramos, F. Alarcon-Aguilar, A. Lara-Lemus, J. L. Flores-Saenz, Arch. Med. Res. 23 (1992) 59.
12. G. Stanić, D. Gavrić, D. Brkić, M. Plazibat, Farm. Glas. 53 (1997) 369.
13. H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski, Drogenanalyse, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1983.
14. E. Stahl, P. J. Schorn, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 325 (1961) 263.
15. H. Schilcher, Die Kamille, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1987, 90.
16. Th. Kartnig, O. Wegscheider, J. Chromatogr. 61 (1971) 375.

(Primljeno 27. X. 1999.)