

LEK. SIROV.	God. XX	BROJ 20	Str. 21-26	Beograd 2001.
LEK. SIROV	Vol. XX	No. 20	PP. 21-26	Belgrade 2001.

Originalni naučni rad - Original Scientific Paper

UDC 582.579.2:581.4

FITOHEMIJSKA I ANATOMSKA ANALIZA VRSTE *IRIS REICHENBACHII* HEUFF.

Katarina Šavikin-Fodulović¹, Danilo Stojanović², Nebojša Menković¹

¹ Institut za proučavanje lekovitog bilja Dr Josif Pančić, Tadeuša Koščuška 1, 11000 Beograd, ² Institut za botaniku, Farmaceutski fakultet, Vojvode Stepe 450, 11000 Beograd

IZVOD

Vrsta *Iris reichenbachii* je endemit Balkanskog poluostrva i Rumunije. Do sada nije farmakognoksijski izučavana. U ovom radu je ispitivana anatomska građa lista pri čemu je uočena specifična orijentacija provodnih snopića. Prisustvo sekundarnih metabolita ispitivano je u uzorcima listova, cvetova, plodova i rizoma. Detektovana su jedinjenja g-pironske strukture (ksantoni, flavonoidi) među kojima se po zastupljenosti u uzorcima, kao i po količini ističe ksanton mangiferin. Sadržaj mangiferina varira zavisno od faze razvića i biljnog organa (0.5% - 8.34%). Detektovani su i sekoiridoidi od kojih se u značajnijoj količini pojavljuju svercijamarin i genciopikrin.

Ključne reči: Iris reichenbachii, ksantoni, mangiferin.

UVOD

U Flori Srbije zastupljeno je 13 *Iris* vrsta (1). Dve vrste, *I. florentina* L. i *I. germanica* L. se koriste u narodnoj medicini (2). Droga *Iridis rhizoma* sadrži oko 0.2% etarskog ulja u kome dominira iron (10-20%) i to kao α , β i γ -iron, koji ima karakterističan miris na ljubičicu. Etarsko ulje sadrži i miristinsku kiselinu, aromatične aldehide i ketone, šeskviterpene i naftalene (3). Droga sadrži i flavonoide, posebno izoflavonoide (irilon, irisolon, irigenin, tektoridin i dr.), a detektovani su i C-glikozidi ksantona (3).

Droga se u narodnoj medicini uglavnom koristi kao ekspektorans i demulcent (3). Sprašeni rizom služi za izradu zubnog i kozmetičkog praška i u parfimeriji (2).

U naučnim studijama je pokazano da neki flavonoidi iz rizoma perunike, a posebno izoflavonoid irigenin, inhibiraju cAMP fosfodiesterazu (4). I druga jedinjenja izolovana iz nekih *Iris* vrsta pokazala su farmakološku aktivnost. Iz rizoma *I. tectorum* (5) izolovan je

triterpenoid koji je pokazao stimulatívno dejstvo na diferencijaciju ćelija HL 60 promielitične leukemije; oligostilbeni ampelopsin B i α -viniferin iz semena *I. clarkei* (6) deluju antagonistički na aktivnost 20-hidroksiekdizon u B (II) ćelijskoj liniji kod *Drosophila melanogaster*, dok lektin izolovan iz listova *I. hybrida* (7) specifično vezuje N-acetil-galaktozamin i laktozu.

Vrsta *I. reichenbachii* Heuff. (syn. *I. serbica* Panč.), zečja ružica, je endemična vrsta Balkanskog poluostrva i Rumunije (1). Biljka je višegodišnja, visoka 18-27 (35) cm, sa debelim rizomom. Listovi pravi ili blago srpasto povijeni. Cvetovi žuti, dvopolni, blago mirišljavi. Cveta V-VI. Naseljava suve livade i pašnjake, proređene bukove šume, krečne stene i kamenjare (1).

Ova vrsta do danas nije hemijski proučavana niti je detaljnije dat opis anatomske građe lista. Zbog toga je predmet ovog rada analiza anatomske građe lista *I. reichenbachii* kao i preliminarna analiza sekundarnih metabolita podzemnih i nadzemnih delova zečje ružice sakupljenih u različitim fazama razvića.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal (listovi, cvetovi, čaure, rizomi) je sakupljen na planini Suvobor (800 m) u periodu od aprila do jula 1999 i 2000 god.

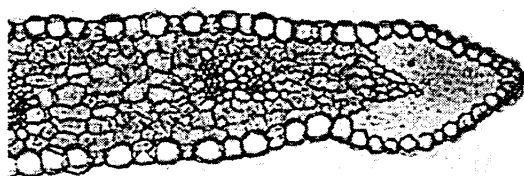
Trajni anatomski preparati listova pravljani su na klizećem mikrotomu. Nakon fiksacije u 50% EtOH bojeni su safraninom i alcijan plavim.

Osušeni uzorci su ekstrahovani metanolom 30 min, na vodenom kupatilu (70⁰C), uz povratni hladnjak. Odnos droga : rastvarač = 1 : 10. Profiltrirani ekstrakti su analizirani tankoslojnom (TLC) i tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (HPLC). TLC: uslovi za γ -pirone: sloj - TLC celuloza F₂₅₄, 0.1 mm (Fluka); mobilna faza - 15% HOAc u vodi; detekcija - dnevno svetlo i UV_{254/366} pre i posle prskanja 5% AlCl₃ u EtOH. Uslovi za sekoiridide: sloj - silika gel 60 F₂₅₄ 0.2 mm (Merck); mobilna faza - CHCl₃ : EtOH = 75 : 25; detekcija - UV_{254/366} posle prskanja sa 0.2% Red Saltz B u vodi i 20% K₂CO₃ u vodi. HPLC: instrument - Hewlett Packard HPLC model 1090, DAD detekcija (HP 1040 A); kolona - Lichrospher RP-18 (5 μ m) 250x4 mm I.D. (Merck); mobilna faza - acetonitril (A) i voda (HPLC čistoće) sa 1% 0.1N H₃PO₄ (B), protok 0.8 ml/min, eluiranje u gradijentnom modu. UV spektri MeOH rastvora izolovanih jedinjenja su mereni na HP 8543 UV-VIS spektrometru. IR spektri su mereni na Perkin Elmer FT-IR 1725 (KBr) spektrometru. MS podaci su dobijeni na FINNIGAN MAT 8230 (DCI-izobutan) masenom spektrometru na 150 eV. ¹H-NMR spektri su snimani u CDCl₃ na sobnoj temperaturi na VARIAN GEMINI 2000 aparatu na 200 MHz.

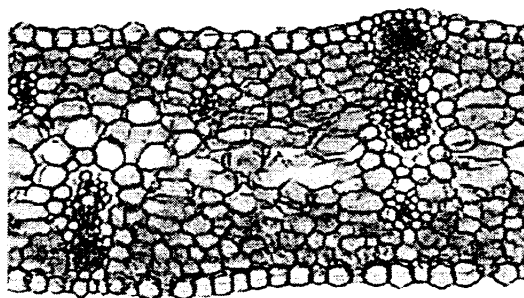
Mangiferin je izolovan iz listova *I. reichenbachii* sakupljenih u fazi plodonošenja koristeći metodu po Glizinu i saradnicima (8). Dekuzatin je izolovan iz cvetova *I. reichenbachii* koristeći metodu po Krstić i saradnici (9). Kao referentne supstance korišćeni su standardi genciopikrin i svercijamarin ranije izolovani iz vrsta *Gentiana lutea* i *Centaureum erythraea* (10, 11). Izolovane komponente su identifikovane pomoću hromatografskih i spektroskopskih podataka. Struktura je potvrđena korišćenjem UV, IR i ¹H-NMR tehnika.

REZULTATI I DISKUSIJA

Anatomija lista: List je 19 – 33 cm dug, 9 – 15 (20) mm širok, uspravan ili malo srpasto povijen. Osnovom obavija stabljiku, u slobodnom delu liska je spljoštena, unifacijalne građe, upravna na tangentu stabljike kao kod *I. germanica* (12). Na površini unifacijalne liske, na poprečnom preseku (sl. 2a i 2b), zapaža se epidermis sačinjen od krupnih skoro izodijametričnih ćelija, zadebljelih spoljašnjih ćelijskih zidova. Anomocitne stome su u transverzalnim nizovima. Čelije zatvaračice su uvučene u odnosu na površinu lista. Epidermis je pokriven kutikulom koja često formira papilozne izraštaje. Mezofil nije izdiferenciran na palisadno i sunderasto tkivo, već je sačinjen od parenhimatičnih ćelija, krupnijih u središnjem delu lista i sitnijih, sa brojnim hloroplastima, ispod epidermisa. Provodni snopići su specifično orjentisani: u središnjem, širem delu preseka, zapaža se dva reda provodnih snopića, kod kojih je ksilem orjentisan ka centru, a floem ka površini liske; u užem delu, postoji jedan niz snopića, kod kojih se raspored ksilema i floema smenjuje, tako da susedni snopići imaju suprotnu orjentaciju ksilema i floema. U središnjem delu liske, floem je sa sklerenhimskim vlaknima. U užem, perifernom delu, snopići su bez sklerenhima. Ksilem je sačinjen uglavnom od traheida (13). Po obodu, ispod epidermisa, nalazi se moćna sklerenhimska kapa, koja daje čvrstinu čitavom listu.



Slika 1a. Anatomski presek vrha lista *Iris reichenbachii*.



Slika 1b. Anatomski presek središnjeg dela lista *I. reichenbachii*.

Sekundarni metaboliti: Prisustvo sekundarnih metabolita γ -pironске i sekoiridoidne građe i sadržaj ksantona mangiferina ispitivani su u listovima sakupljenim pre cvetanja (april), u fazi cvetanja (maj) i fazi plodonošenja (juni) i u toku jeseni (septembar), kao i u cvetovima,

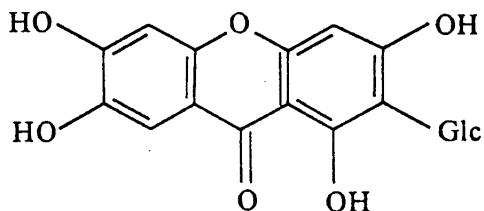
čaurama sa semenom i rizomima (juni i septembar). Iz uzorka listova pre cvetanja izolovan je, kao dominantno jedinjenje, ksantonski C-glikozid mangiferin. Izolovan je još jedan ksantonski glikozid 2,3,6,8 poretka supstitucije čija struktura nije detaljno razjašnjena. Od gorkih jedinjenja prisutan je svercijamarin u manjoj količini (0.60%), a flavonoidi i aromatične kiseline su prisutne u tragovima. U uzorku listova u fazi cvetanja detektovan je mangiferin i pomenuti ksantonski glikozid. U istom uzorku kao dominantno jedinjenje izolovan je ksanton dekuzatin koji se ne pojavljuje u ostalim uzorcima listova. Detektovana su i 3 sekoiridoida među kojima je po količini dominantan svercijamarin (0.51%). U uzorku listova u fazi plodonošenja javlja se samo mangiferin u velikom procentu, dok su sva ostala jedinjenja prisutna samo u tragovima. Isti je slučaj i sa uzorkom listova sakupljenih u septembru.

Cvetovi sadrže manju količinu mangiferina u odnosu na listove, dok je u značajnoj količini prisutan dekuzatin. Od gorkih jedinjenja dominira genciopikrin (1.12%). Sa druge strane, u čaurama nije prisutan dekuzatin, a dominantno jedinjenje je mangiferin. U nešto većoj količini se javljaju aromatične kiseline, pre svega hlorogenska a od sekoiridoida genciopikrin sa 2.40%.

Rizom *I. reichenbachii* se od nadzemnih organa razlikuje po broju i vrsti prisutnih sekundarnih metabolita. Pored mangiferina i ksantonskog glikozida nerazjašnjene strukture izolovan je i izoflavonoid iridin, a prisutna su i jedinjenja terpenoidne strukture. Najveći sadržaj genciopikrina detekovan je u rizomima sakupljenim u toku jeseni (6.80%).

Primećena je značajna dinamika u pojavljivanju sekundarnih metabolita u različitim fazama razvića, a posebno je karakteristično variranje sadržaja mangiferina. Sadržaj mangiferina se značajno razlikuje i u različitim organima biljke. Najmanji sadržaj mangiferina detektovan je u cvetovima (0.5%) dok, u listovima sakupljenim u fazi plodonošenja on iznosi čak 8.34%. Sadržaj mangiferina visok je i u listovima sakupljenim u septembru, kao i rizomima sakupljenim u junu (Tab. 1).

Ovakva složena kompozicija sekundarnih metabolita čini vrstu *I. reichenbachii* veoma interesantnom, potencionalno novom lekovitom sirovinom. Ovo se posebno odnosi na listove koji se odlikuju vrlo visokim sadržajem mangiferina (slika 2), jedinjenja sa izraženim antidepresantnim (14), antioksidativnim (15) i antivirusnim delovanjem (16).



Slika 2. Mangiferin

Tabela 1. Sadržaj sekundarnih metabolita u listovima, cvetovima, plodovima i rizomima vrste *Iris reichenbachii*.

Uzorak	Mangiferin (%)	Svercijamarin (%)	Geniopikrin (%)
List (pre cvetanja, april)	2.11	0.60	-
List (u fazi cvetanja, maj)	1.53	0.51	-
List (u fazi plodonošenja, juni)	8.34	-	-
List (septembar)	4.19	-	-
Cvet	0.54	-	1.12
Plod (čaura sa semenom)	1.41	-	2.40
Rizom (juni)	5.83	-	1.41
Rizom (septembar)	1.62	-	6.80

LITERATURA

1. L. Stjepanović-Veseličić (1976) *Iris reichenbachii* Heuff. - In: Josifović, M. (ed.), Flora SR Srbije VIII, SANU., Beograd, 15.
2. J. Tucakov (1996) Lečenje biljem, Rad, Beograd, 538-539.
3. M. Wichtl (1994) Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, ed. N. G. Bisset, Medpharm, Scientific Publishers, Stuttgart, 278-280.
4. R. Nikaido, T. Ohmato, U. Sankana, T. Hamanava, K. Totsuka (1982) *Planta Med.* 46, 162-166.
5. K. Takahashi, Y. Hano, M. Suganuma, S. Okabe, T. Nomura (1999) 28-deacetylbelamcandol, a tumor-promoting triterpenoid from *Iris tectorum*, *J. Nat. Prod.* 62 (2), 291-293.
6. K. Keckeis, S. D. Sarker, L. Dinan (2000) Resveratrol-type oligostilbenes from *Iris clarkei* antagonize 20-hydroxyecdysone action in the *Drosophila melanogaster* B (II) cell line, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2), 333-336.
7. M. Ferens-Sieczkowska, M. Orczyk-Pawilowich, B. Morawiecka (1997) The N-acetylgalactosamine and lactosamine specific lectin from *Iris hybrida* leaves, *Acta Biochim. Pol.* 44 (2), 301-307.
8. V. I. Glizin, G. G. Nikolaeva, T. D. Dargaeva (1986) Prirodni ksantoni, Nauka, Novosibirsk, 14-19 (na ruskom).
9. D. Krstić (1998) Ontogeneza *Centaureum pulchellum* (Sw) Druce u kulturi *in vitro* i analiza sekundarnih metabolita, Magistarski rad, Biološki fakultet, Beograd.
10. N. Menković (1997) Fitohemijsko ispitivanje *in vitro* kultura vrsta *Gentiana lutea* L., *lincura* i *G. punctata* L., arnautski raven, Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Beograd.
11. T. Janković (1998) *In vitro* kultura kičice *Centaureum erythraea* Rafn. i analiza sadržaja ksantona i sekoiridoida, Magistarski rad, Biološki fakultet, Beograd.
12. Fan (1974) *Plant anatomy.*, Pergamon Press., Oxford.

13. K. Esau (1977) *Anatomy of Seed Plants.*, John Wiley and Sons., New York.
14. S. K. Bhattacharya, A. K. Sanyal, S. Ghosal (1972) Monoamine oxidase-inhibiting activity of mangiferin isolated from *Canscora decussata*, *Naturwissenschaften* 59 (12) 651.
15. T. Sato, A. Kawamoto, A. Tamura, Y. Totsumi, T. Fujii (1992) Mechanism of antioxidant action of pueraira glycoside (PG)-1 (an isoflavonoid) and mangiferin (a xanthonoid), *Chem. Pharm. Bull.* 40 (3). 721-724.
16. Yoosook, N. Bunyaphrathatsava, Y. Boonyaniat, C. Kantasuk (2000) Anti-herpes simplex virus activities of crude water extracts of Thai medicinal plants, *Phytomedicine* 6 (6), 411-419.

PHYTOCHEMICAL AND ANATOMIC STUDY OF PLANT SPECIES *IRIS REICHENBACHII* HEUFF.

Katarina Šavikin-Fodulović¹, Danilo Stojanović², Nebojša Menković¹

¹ Institute for Medicinal Plants Research "Dr Josif Pančić", Tadeuša Koščuška 1, 11000 Belgrade,

² Institute of Botany, Faculty of pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11000 Belgrade

Summary

Iris reichenbachii Heuffel (Iridaceae) is an endemic plant species of Balcan peninsula and Romania. Pharmacognostic study of this species are not done till now. The microscopic preparations of the leaves were analysed and specific orientation of vessels were noticed. Secondary metabolites were analysed in the samples of leaves collected in different vegetative phase, flowers, fruits and rhizomes. In the samples, g-pyrone and secoiridoids were detected. Among γ -pyrones, a xanthone C-glycoside mangiferin were one of the most abundant compound. It's content varied from 0.5% - 8.34% depending of plant organ or vegetative phase of development.