

FENOLICKÉ METABOLITY LISTOV *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc.

PAVEL MUČAJ^a, MILAN NAGY^a, FRANTIŠEK ŠERŠEŇ^b, EMIL ŠVAJDLENKA^c, JOSEF DROZD^c, MICHAL ŠTUBER^d a TIBOR LIPTAJ^d

^a Katedra farmakognózie a botaniky, Farmaceutická fakulta, Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, SR, ^b Chemický ústav, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, SK-842 15 Bratislava, SR, ^c Ústav prírodných liečiv, Farmaceutická fakulta VFU, Palackého 1-3, 612 42 Brno, ČR, ^d Ústav analytickej chémie, Oddelenie NMR a hmotnostnej spektrometrie, FCHPT STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, SR mucaji@fpharm.uniba.sk

Došlo 17.7.11, prepracované 2.11.11, prijaté 23.11.11.

Kľúčové slová: *Karwinskia humboldtiana*, antioxidačná aktivita, flavonoidy

Úvod

Rod *Karwinskia* z čeľade Rhamnaceae zahŕňa 15 druhov stromov alebo krov rastúcich v subtropických a tropických oblastiach Severnej Ameriky. *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc. je najrozšírenejším a najznámejším druhom tohto rodu. V týchto oblastiach je známa ako jedovatá rastlina, ktorá pri intoxikácii plodmi poškodzuje organizmus niektorých zvierat a ľudí. Po požití plodov rastliny sa rozvíja vzostupná symetrická paralýza končiaca paralýzou dýchacích svalov, čo môže zapríčiniť smrť^{1,2}. Za tento účinok sú zodpovedné toxíny, identifikované ako 9,10-dihydroxyantracénóny a označované na základe ich molekulových hmotností (T-496, T-514, T-516 a T-544). Najvýznamnejším z nich je toxín T-514 (peroxizomicín A1), ktorý poškodzuje peroxizómy. Známý je aj jeho toxický efekt na rakovinové bunky pečeneového a pľúcneho tkaniva a tkanív hrubého čreva. Mechanizmus tohto účinku zatiaľ nebol úplne vysvetlený. Je však známe, že indukuje apoptózu ľudských promyelocytických leukemických buniek (HL-60) a je inhibítorom topoizoméry II (cit.^{3,4}). Väčšina prác zaoberajúcich sa obsahovými látkami rodu *Karwinskia* sa venuje spomínaným toxínom, ich účinkom resp. stanoveniu v rôznych častiach rastlín^{5,6}.

Cieľom práce bolo stanoviť antioxidačnú účinnosť metanolového extraktu listov *Karwinskia humboldtiana* po jeho rozdelení medzi vzájomne sa nemišajúce rozpúšťadlá a na základe zistenej antioxidačnej aktivity izolovať látky, ktoré by sa nej mohli podieľať. Antioxidačná aktivi-

ta jednotlivých podielov (petroléterový, chloroformový, etylacetátový, *n*-butanolový a vodný) bola vyhodnotená ako schopnosť vychytávať DPPH a hydroxylové radikály.

Experimentálna časť

Chemikálie a prístroje

5,5-Dimetyl-1-pyrolin-*N*-oxid (DMPO) a 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH) a acetonitril pre HPLC vyrába Sigma-Aldrich Ltd. (USA). Metanol, 1-butanol (*n*-butanol), petroléter, chloroform, benzén, acetón, dimetyl-sulfoxid (DMSO), octan etylový (etylacetát), izopropanol (*i*-PrOH) a 2-butanón – vždy p.a. kvality, CH₃COOH (98%, p.a.), HCOOH (85%, p.a.), HCl (35%, p.a.) a H₂O₂ (30%) dodáva Centralchem, s.r.o, Slovensko. BSTFA (bis-trimethylsilyltrifluoracetamid), TMCS (trimetylchlorosilán) a CD₃OD vyrába Sigma-Aldrich Ltd. (USA).

Absorpčné spektrá boli snímané prístrojom Tecan Infinite M 200 (Tecan AG, Rakúsko) v metanole ako aj po následnom pridaní špecifických diagnostických skúmadiel⁷. Spektrá elektrónovej paramagnetickej rezonancie (EPR) boli zaznamenávané prístrojom ERS 230 (ZWG Akad. Wiss. Berlin, SRN).

Optická otáčavosť bola meraná na prístroji Polamat A (C. Zeiss Jena, SRN) v metanole.

Podmienky HPLC analýzy: prístroj Hewlett-Packard HP 1100 s DAD detektorom. Ako stacionárna fáza bola použitá kolóna Eclipse XDB C18, 50 × 2,1 mm s veľkosťou častíc 1,8 μm. Mobilná fáza: 0 min: 10 % acetonitril + 90 % 0,2% HCOOH, 36 min: 100 % acetonitril. Prietoková rýchlosť 0,3 ml min⁻¹ pri 30 °C.

Na GC-MS analýzu bol použitý GC-MS system Finnigan GCQ Polaris ion trap, so silikagélou kolónou HP -5ms 30 m × 0,25 mm. Teplotný program pre štandardy TMS derivátov sacharidov: 100 °C – 1 min, potom gradient 10 °C min⁻¹ k dosiahnutiu 280 °C, zachovanie počas 2 min. Teplota injektora 270 °C, nástrekový objem 1 μl, nosný plyn hélium, lineárna rýchlosť 30 cm s⁻¹. MS parametre: teplota iónového zdroja 220 °C, ionizačná energia 70 eV, skenovaná oblasť 50–650 *m/z*. Úprava vzorky pre GC-MS analýzu sa uskutočnila podľa literatúry⁸.

MS spektrá boli merané metódami APCI a ESI v negatívnom móde prístroja Agilent 1100 LC/MSD Ion-Trap VL. Separácia za podmienok uvedených pre HPLC-DAD.

NMR spektrá boli zaznamenané prístrojom Varian Inova 600 MHz spektrometer v CD₃OD.

Nosiče pre stĺpcovú chromatografiu: silikagél (typ Silpearl, Kavalier, Votice, ČR), Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko) a polyamid S 6 (Riedel de Haen AG, Seelze-Hannover, SRN). Nosiče pre TLC: silikagélové fólie Silufol UV₂₅₄ a celulózové fólie Lucefol (Kavalier, Votice, ČR), polyamidové fólie DC-Alufolien Polyamid 11 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, SRN). Skúmadlá na detekciu TLC (cit.⁹): Naturstoffreagenz A (Fluka, SRN) + polyetylenglykol 4000 (NEUovo skúmad-

lo) v metanole a anilínftalát (Sigma-Aldrich, USA). β -glykozydáza (Fluka, SRN).

Enzymová hydrolýza a kyslá hydrolýza sa uskutočnila podľa postupu v literatúre¹⁰.

Použitie štandardy (kvercetín, rutín, kempferol-3-*O*-rutinozid, hyperozid, izokvercitrín, galaktóza a arabinóza) dodáva C. Roth GmbH & Co, Karlsruhe, SRN.

Extrakcia a izolácia látok

Listy *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc. (pestovaného v skleníku Prírodovedeckej fakulte UK v Bratislave) boli zozbierané koncom septembra 2007. Metanolový extrakt získaný maceráciou 220 g suchých listov bol vysušený na rotačnej odparke pri teplote 40 °C. Získalo sa 120 g suchého extraktu.

19,31 g metanolového extraktu (100 %) sa rozpúšťalo v 400 ml vody a vzniknutá suspenzia sa vytrepala postupne petroléterom, chloroformom, etylacetátom a *n*-butanolom, pričom na záver ostal vodný podiel. Po odparení jednotlivých výtrepkov sa získalo 5,85 g petrolérového podielu (30,29 %), 0,2 g chloroformového podielu (1,03 %), 1,7 g etylacetátového podielu (8,8 %), 3,2 g *n*-butanolového podielu (16,57 %) a 8,35 g vodného podielu (43,24 %).

Antioxidačná aktivita

Antioxidačná aktivita extraktov bola stanovená dvoma spôsobmi: spektrofotometricky – pomocou vychytávania radikálov DPPH a pomocou EPR-sledovaním vychytávania hydroxylových radikálov¹¹. Výsledky sú priemernom štyroch meraní.

Výsledky a diskusia

Zistili sme, že všetky analyzované extrakty vychytávali DPPH radikály, pričom ich účinnosť bola v poradí: etylacetátový > *n*-butanolový > petrolérový > chloroformový > vodný. Etylacetátový podiel mal účinnosť väčšiu ako známe antioxidačné štandardy, kvercetín a *L*-askorbová kyselina (tab. I).

Pripravené extrakty vychytávali tiež hydroxylové radikály. V tab. II je prezentovaná účinnosť vychytávania hydroxylových radikálov roztokom 1 mg extraktu v 120 μ l

Tabuľka I

SC₅₀ hodnoty vychytávania DPPH radikálov extraktmi zo suchých listov *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc

Extrakt	SC ₅₀ [μ g odparku/ml]	r ²
Petroléter	8,48	0,936
Chloroform	21,05	0,977
<i>n</i> -Butanol	6,28	0,996
Etylacetát	2,11	0,998
Voda	55,34	0,977
Kyselina <i>L</i> -askorbová	2,21	0,998

vody. Z údajov je zrejmé, že antioxidačná účinnosť klesá v poradí: etylacetátový = chloroformový > *n*-butanolový > petrolérový > vodný extrakt.

Vychádzajúc z antioxidačnej aktivity podľa namerných hodnôt SC₅₀ metódou DPPH a dostupného množstva podielov sa *n*-butanolový podiel delil na kolóne Sephadexu LH-20. Ako elučná sústava bol zvolený *i*-PrOH. Zachytávané frakcie mali objem približne 100 ml, celkovo sa zachytilo 87 frakcií. Na základe TLC analýzy a detekcie NEUovým skúmadlom boli jednotlivé frakcie spojené do 11 základných frakcií.

Rechromatografiou frakcie č. 3 na silikagéli použitím elučnej sústavy chloroform : metanol (9 : 1, so zvyšujúcim sa podielom polárnej zložky) bola získaná látka č. 1 (2,3 mg).

Frakcia č. 4 bola prečistená rovnakým spôsobom ako predchádzajúca frakcia a získala sa látka č. 2 (3 mg).

Frakcia č. 7 sa delila na stĺpci silikagélu za použitia zmesi chloroform : metanol : voda (8,5 : 1,5 : 0,1) ako elučnej sústavy. Frakcie sa zachytávali v objeme asi 70 ml, celkovo sa ich zachytilo 71. Na základe TLC analýzy boli jednotlivé frakcie spojené do 28 frakcií (I–XXVIII).

Z frakcie č. IV sa po odparení na rotačnej vákuovej odparovačke získala látka č. 3 (3,1 mg), z frakcie č. XIII vykryštalizovala látka č. 4 (8,3 mg) a z frakcie č. XV vykryštalizovaním z elučnej sústavy sa získala látka č. 5 (8,7 mg). Frakcia č. XXI po odparení poskytla látku č. 6 (6,7 mg). Frakcia č. XXIV sa delila na stĺpci polyamidu v sústave benzén : metanol : 2-butanón : *n*-butanol (300 :

Tabuľka II

Účinnosť vychytávania hydroxylových radikálov extraktmi z listov *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc. (1 mg extraktu/120 μ l vody)

Extrakty ^a	Petroléter (nasýtený roztok)	Chloroform (nasýtený roztok)	<i>n</i> -Butanol	Etylacetát	Voda
Účinnosť vychytávania, %	66,5	100	58,8	100	57,6

^aHodnota SC₅₀ pre *L*-askorbovú kyselinu (kontrola) je 0,01 mg ml⁻¹

100 : 75 : 1,5). Zachytávali sa frakcie s objemom asi 2 ml. Celkovo bolo zachytených 60 frakcií. Na základe TLC analýzy boli jednotlivé frakcie spojené a z nich sa získali látky č. **7** (4,1 mg) a **8** (1,4 mg). Množstvá izolovaných látok nezodpovedajú ich reálnemu zastúpeniu v rastline.

Látka č. **1** bola izolovaná vo forme žltého amorfneho prášku. UF spektrá získanej látky poukazovali na jej flavonolový skelet substituovaný v polohe C-3. Hmotnostné spektrum zaznamenané metódou ESI v negatívnom móde potvrdilo molekulový ión Mr 418 (417+1) s fragmentom 132 amu (pentóza) a aglykónom s Mr 286 (285+1). Kyslá hydrolyza uskutočnená na tenkej vrstve silikagélu s následným porovnaním so štandardom kempferolu potvrdila jeho prítomnosť v hydrolyzovanom izoláte. Sacharidová zložka bola na základe GC-MS identifikovaná ako arabinóza. Na základe uvedených výsledkov bola látka č. **1** identifikovaná ako kempferol-3-*O*-arabinozid.

Látka č. **2** bola izolovaná vo forme žltého prášku. UF spektrá látky v metanole a po pridaní špecifických diagnostických skúmadiel poukazovali na flavonolový typ s *ortho*-dihydroxy skupinou na kruhu B. Kyslou hydrolyzou uskutočnenou na TLC sa porovnaním so štandardom dokázal kvercetín ako aglykón. Porovnaním TLC po enzymatickej hydrolyze izolovanej látky bola vo vodnej fáze dokázaná prítomnosť glukózy. MS (negatívny mód) poukázalo na molekulový ión s Mr 464 (463+1), fragment 162 (hexóza-H₂O) a aglykón s Mr 302 (301+1). Priamym porovnaním izolovanej látky a štandardu izokvercitrínu (kvercetín-3-*O*-glukozid) TLC chromatografiou na silikagéli bola látka identifikovaná ako izokvercitrín.

Látka č. **3** bola izolovaná vo forme žltého prášku. UF spektrá získanej látky sa zhodovali so spektrami kvercetínu⁷. MS (ESI, APCI, negatívny mód) poukázali na molekulový ión s Mr 302 (301+1). Priamym porovnaním izolovanej látky a štandardu kvercetínu TLC chromatografiou na silikagéli bola látka identifikovaná ako kvercetín.

Látka č. **4** bola izolovaná vo forme žltých kryštálikov. MS zaznamenané metódou ESI v negatívnom móde poukázalo na molekulový ión Mr 434 (433+1) s fragmentom 132 amu (pentóza-H₂O) a aglykónom s Mr 302 (301+1). Na základe ¹H a ¹³C NMR spektier bola látka č. **4** identifikovaná ako kvercetín-3-*O*- α -L-arabinozid. NMR spektrá sú dostupné u autorov (T.L., M.Š.).

Látka č. **5** bola získaná vo forme ihlicovitých kryštálov. MS (ESI, APCI, negatívny mód) poukázali na molekulový ión s Mr 290 (289+1). Na základe ¹H a ¹³C NMR spektier bola látka č. **5** identifikovaná ako katechín s *cis* konfiguráciou na uhlíkoch C-2 resp. C-3 (epikatechín). Izolovaná látka bola opticky aktívna s hodnotou $[\alpha]_{D}^{20} = +65^{\circ}$. Na základe otáčavosti roviny polarizovaného svetla bol izolát identifikovaný ako (+)-epikatechín¹². NMR spektrá sú dostupné u autorov (T.L., M.Š.).

Látka č. **6** bola izolovaná vo forme žltého prášku. UF spektrá získanej látky sa zhodovali so spektrami kvercetín-3-*O*-galaktozidu⁷. MS (ESI, APCI, negatívny mód) poukázali na molekulový ión s Mr 464 (463+1), fragment 162 (hexóza-H₂O) a aglykón s Mr 302 (301+1). Priamym porovnaním izolovanej látky a štandardu hyperozidu

Tabuľka III

SC₅₀ hodnoty vychytávania DPPH radikálov izolovanými látkami z listov *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc.^a

Izolovaná látka	SC ₅₀ [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	r ²
(+)-Epikatechín	2,97	0,958
Kvercetín	2,79	0,997
Kvercetín-3- <i>O</i> -arabinozid	5,08	0,957
Rutín	6,55	0,989
Hyperozid	38,67	0,968
Kempferol-3- <i>O</i> -rutinozid	neúčinný	

^a Antioxidačná aktivita izokvercitrínu a kempferol-3-*O*-arabinozidu nebola stanovená vzhľadom na ich malé množstvo

(kvercetín-3-*O*-galaktozid) bola látka identifikovaná ako hyperozid.

Látka č. **7** bola izolovaná vo forme žltého prášku. UF spektrá získanej látky sa zhodovali so spektrami kvercetín-3-*O*-rutinozidu (rutínu)⁷. Priamym porovnaním izolovanej látky a štandardu rutínu TLC chromatografiou na silikagéli, polyamidových a celulózových fóliách bola látka identifikovaná ako rutín.

Látka č. **8** tvorila po odparení elučnej sústavy nažltlý povlak na stenách banky. Priamym porovnaním izolovanej látky a štandardu pomocou TLC chromatografie na silikagéli bola látka identifikovaná ako kempferol-3-*O*-rutinozid.

Záver

Na základe zistenej antioxidačnej aktivity a dostupnosti jednotlivých podielov získaných rozdeľovaním metanolového extraktu listov *Karwinskia humboldtiana* bolo z butanolového podielu izolovaných 7 flavonolových derivátov (kvercetín, jeho glykozidy a glykozidy kempferolu) a (+)-epikatechín. Izolované látky sa svojou antioxidačnou aktivitou podieľajú na celkovej antioxidačnej aktivite *n*-butanolového podielu (tab. III). Všetky získané látky boli z rastliny *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc. izolované po prvý raz.

Autori ďakujú za poskytnutý rastlinný materiál prof. RNDr. A. Luxovi, CSc. z Katedry fyziológie rastlín Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave.

Práca vznikla s podporou grantu agentúry VEGA MŠ SR. č. 1/0145/10 a 2/0081/11.

LITERATÚRA

- Becerra-Verdin E. M., Bermúdez-Barba M. V., Salazar-Leal M. E., Ancer Rodríguez J., Romero-Díaz V., Soto-Domínguez A., Ballesteros-Elizondo R. G.,

- Saucedo-Cardenas O., Pineyro Lopez A., Sepúlveda-Saavedra J.: *Toxicon* 53, 645 (2009).
2. Jaramillo-Juarez F., Ortiz G.G., Rodriguez-Vazquez M.L., Falcon-Franco M.A., Feria-Velasco A.: *Gen. Pharmacol.* 26, 649 (1995).
 3. Salazar M., Piñeyro A., Waksman N.: *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 19, 4985 (1996).
 4. Gomez-Silva M., Garza-Ocanas L., Waksman N., Rivas V., Pineyro-López A.: *Toxicol. In Vitro* 19, 47 (2005).
 5. Bovanová L., Brandšteterová E., Čaniová A., Argalášová K., Lux A.: *Pharmazie* 54, 941 (1999).
 6. Bovanová L., Brandšteterová E., Čaniová A., Argalášová K., Lux A.: *J. Chromatogr., B* 732, 405 (1999).
 7. Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B.: *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, New York 1970.
 8. Füzfai Zs., Boldizsár I., Molnár-Perl I.: *J. Chromatogr., A* 1177, 183 (2008).
 9. Merck: *Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography*, str. 118. Merck, Darmstadt 1976.
 10. Šeršeň F., Mučaji P., Grančai D., Nagy M., Švajdlenka E.: *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae* 53, 253 (2006).
 11. Šeršeň F., Mučaji P., Grančai D., Nagy M.: *Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae* 52, 204 (2005).
 12. Devon T. K., Scott A. I.: *Handbook of Naturally Occurring Compounds. Volume I. Acetogenins, Shikimates, and Carbohydrates*, str. 174. Academic Press, Inc., New York 1975.

P. Mučaji^a, M. Nagy^a, F. Šeršeň^b, E. Švajdlenka^c, J. Drozd^c, M. Štjuber^d, and T. Liptaj^d (^a Department of Pharmacognosy and Botany, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Bratislava, ^b Institute of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University Bratislava, ^c Institute of Natural Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, ^d Department of NMR and MS Spectroscopy, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava): **Phenolic Metabolites of *Karwinskia humboldtiana* Leaves**

Methanolic extract from leaves of *Karwinskia humboldtiana* (Schult.) Zucc. was subjected to fractionation with a pair of immiscible solvents and subsequently tested for antioxidant activity. Using DPPH the order of scavenging activities of the extracts in comparison with standards of L-ascorbic acid and quercetin was as follows: ethyl acetate fraction > L-ascorbic acid > quercetin > butan-1-ol > light petrol > chloroform > water. The capability of scavenging OH radicals determined by EPR was as follows: ethyl acetate, chloroform > light petrol > butan-1-ol > water fractions. On the basis of availability and antioxidant activity of these fractions, isolation of constituents from butanol fractions was achieved. Separation of this fraction led to the isolation of (+)-epicatechin and flavonol derivatives – quercetin, quercetin 3-*O*-glucoside (isoquercitrin), quercetin-3-*O*-galactoside (hyperosid), quercetin-3-*O*-arabinoside, quercetin 3-*O*-rutinoside (rutin), kaempferol 3-*O*-arabinoside and kaempferol 3-*O*-rutinoside. All of them might be responsible for the observed antioxidant effects.