

BADANIA FITOCHEMICZNE Z OCENĄ AKTYWNOŚCI PRZECIWPALNEJ *IN VITRO* LIŚCI I KORZENIA ŻYWOKOSTU LEKARSKIEGO



Kimel Katarzyna, Godlewska Sylwia, Pobłocka-Olech Loretta, Krauze-Baranowska Mirosława

Katedra i Zakład Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny z OML, Gdański Uniwersytet Medyczny

WPROWADZENIE

Korzeń żywokostu lekarskiego (*Symphytum officinale* L.) jest wykorzystywany m.in. jako surowiec przeciwzapalny w terapii schorzeń układu mięśniowo-szkieletowego. W związku z obecnością hepatotoksycznych alkaloidów pirrolizydynowych, jego stosowanie wg wytycznych EMA jest ograniczone jedynie do aplikacji miejscowej w krótkotrwałych, 10 dniowych, terapiach. Pomimo długotrwałej tradycji stosowania skład chemiczny korzenia oraz liści żywokostu, jest w pełni nierozpoznany. **Celem badań** była analiza chromatograficzna wyciągów z krajowych surowców otrzymywanych z żywokostu lekarskiego, mianowicie korzenia i liści, oraz ocena ich aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej.

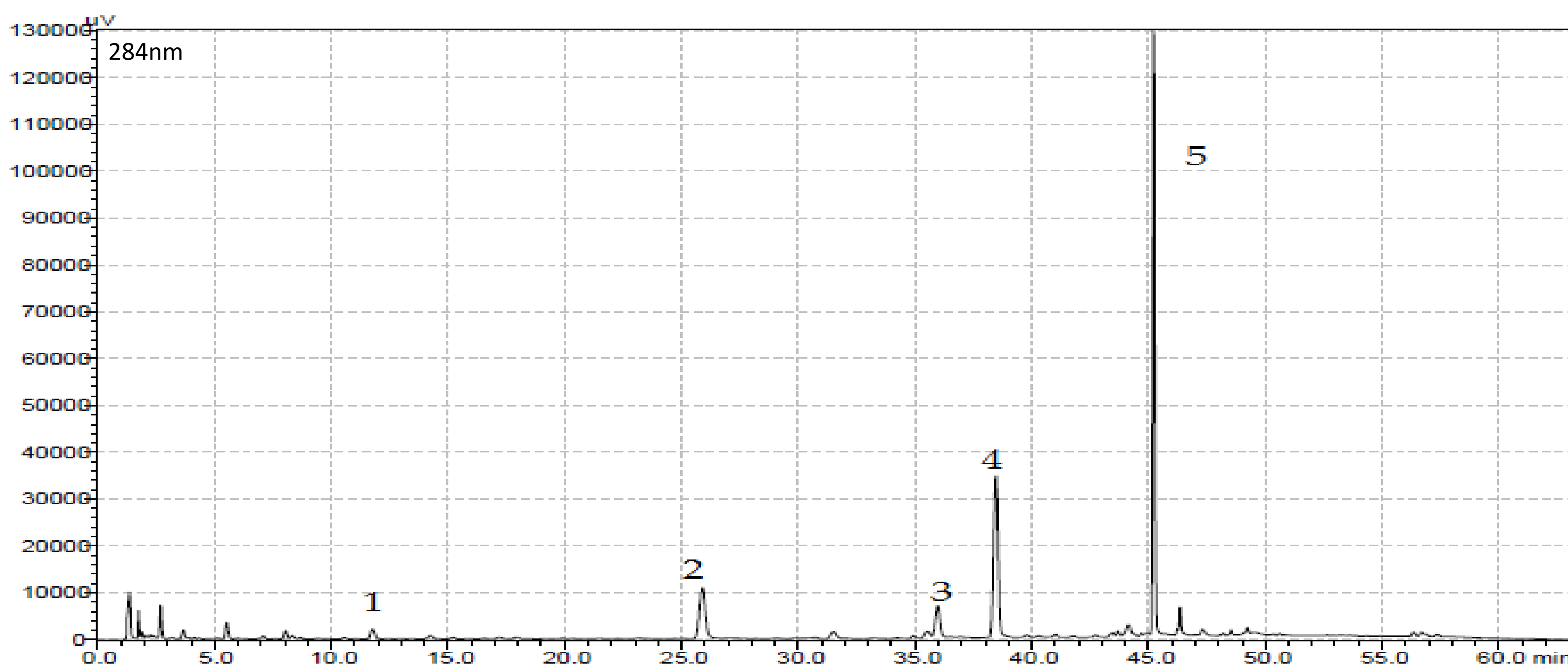
MATERIAŁ ROŚLINNY

Liście (fol) i korzeń żywokostu pochodzące od polskich firm zielarskich (P1-P4) oraz z krajowych ogrodów botanicznych (O1-O4).

Analizowane wyciągi roślinne zostały uzyskane poprzez ekstrakcję surowca metanolem: bezpośrednią (korzeń, 1g/25ml, 15min), ciągłą w aparacie Soxhleta (liście, 5g/50ml) lub maceracją (liście, 20g/600ml, 48h).

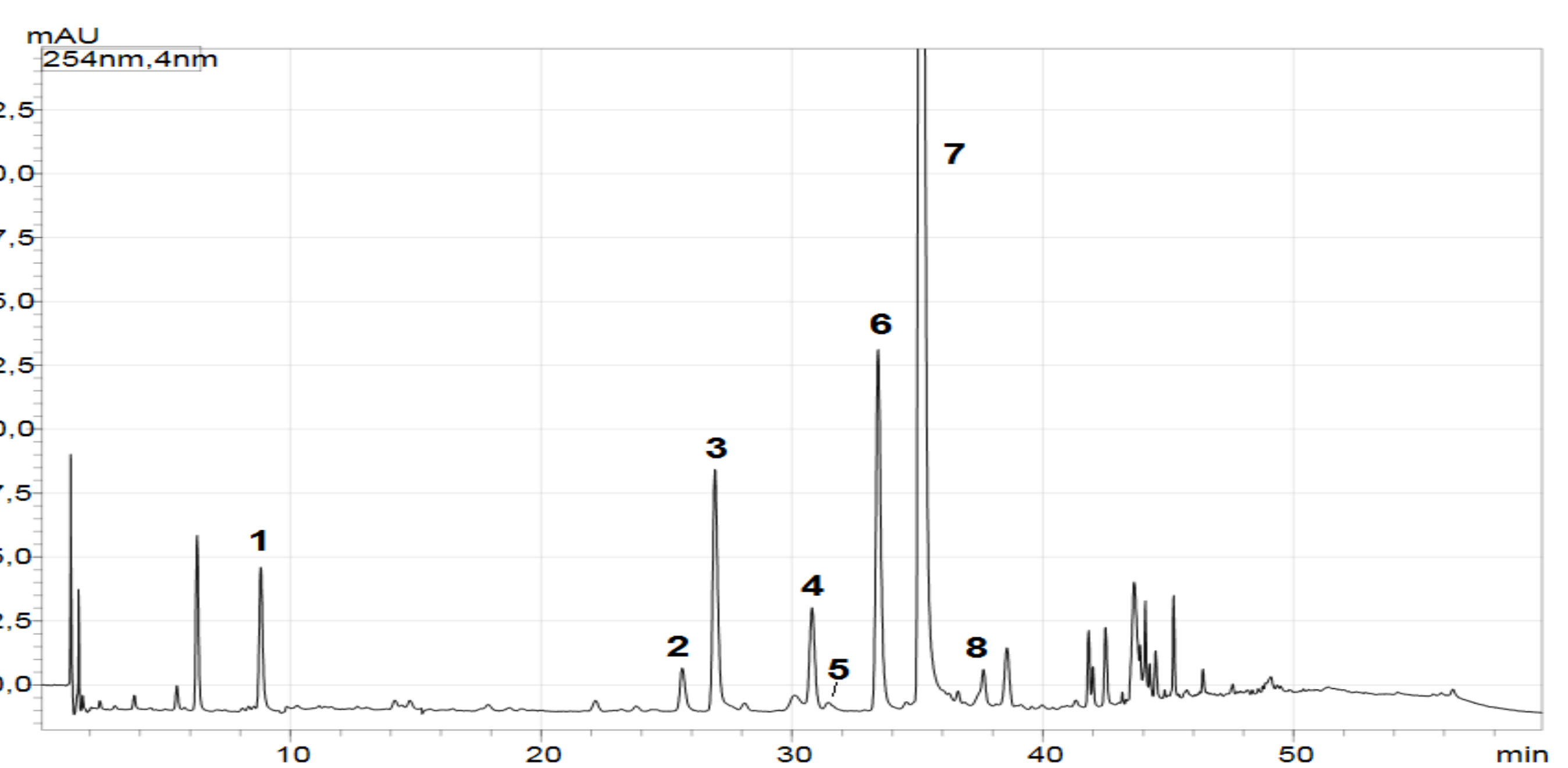
ANALIZA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA SKŁADU CHEMICZNEGO KORZENIA I LIŚCI ŻYWOKOSTU

Korzeń żywokostu (*Symphyti radix*)



Chromatogram HPLC-DAD-UV/Vis wyciągu metanolowego z korzenia żywokostu lekarskiego. Kolumna Kinetex F5 (100x4,6mm), elucja w gradiencie: 0 min – 12% B, 10 min – 20% B, 30 min – 43% B, 50 min – 100% B, 55 min – 100% B, 60 min – 12% B, 70 min – 12% B. A – H₂O/HCOOH (100:0,01), B – ACN/H₂O/HCOOH (50:50:0,01) UV λ = 284 nm, T=35 °C, przepływ – 0,8mL/min, v = 1 μl

Liść żywokostu (*Symphyti folium*)



Chromatogram HPLC-DAD-MS/MS wyciągu metanolowego z liści żywokostu lekarskiego. Kolumna Kinetex C-18 (100x4,6mm), elucja w gradiencie: 0 min – 12% B, 10 min – 20% B, 30 min – 43% B, 50 min – 100% B, 55 min – 100% B, 60 min – 12% B, 70 min – 12% B. A – H₂O/HCOOH (100:0,01), B – ACN/H₂O/HCOOH (50:50:0,01) UV λ = 254 nm, T=35 °C, przepływ – 0,8mL/min, v = 4 μl. Parametry MS: napięcie detektora 4,5 kV/-3,5 kV, blok grzewczy 400 °C, temperatura DL 250 °C, przepływ gazu nebulizującego 2 L/min, przepływ gazu suszącego 20 L/min

L.p.	Nazwa związku	Zawartość związku w surowcu [mg/g suchego surowca ± SD]							
		P1	P2	P3	P4	O1	O2	O3	O4
1.	Kwas kawowy ¹	0,111 ± 0,004	0,108 ± 0,007	0,108 ± 0,007	0,112 ± 0,003	0,11 ± 0,003	0,096 ± 0,005	0,093 ± 0,001	0,088 ± 0,002
2.	Globoidnan B ²	0,551 ± 0,023	0,478 ± 0,021	0,371 ± 0,1	0,531 ± 0,028	0,596 ± 0,1	0,338 ± 0,02	0,657 ± 0,017	0,92 ± 0,093
3.	Rabdozyna ²	0,349 ± 0,012	0,329 ± 0,016	0,294 ± 0,067	0,518 ± 0,023	0,645 ± 0,13	0,221 ± 0,009	0,326 ± 0,011	0,262 ± 0,017
4.	Kwas rozmarynowy ²	1,18 ± 0,021	1,05 ± 0,03	0,489 ± 0,14	1,71 ± 0,061	1,57 ± 0,33	0,695 ± 0,023	1,8 ± 0,06	0,852 ± 0,086
5.	Globoidnan A ³	1,08 ± 0,019	1,05 ± 0,005	0,785 ± 0,31	0,883 ± 0,03	0,985 ± 0,24	0,235 ± 0,006	0,199 ± 0,015	0,587 ± 0,066
*	Alantoina*	20,1 ± 1,5	21,1 ± 3,8	16,6 ± 1,5	3,5 ± 1,7	6,49 ± 1	3,86 ± 1,7	7,51 ± 2,3	<LOQ

L.p.	Nazwa związku	T _R [min]	UV _{max} [nm]	[M+H] ⁺ /[M+H]	Masa [Da]
1.	Kwas kawowy	8,82	295sh, 321	179*	180
2.	3-O-galaktozyd kwercetyny	25,61	254, 266sh, 353	465*, 463	464
3.	3-O-glukozyd kwercetyny	26,92	256, 266sh, 349	465*, 463	464
4.	3-O-galaktozyd kemferolu	30,79	262, 295sh, 349	449*, 447	448
5.	3-O-(6"-malonylo)-glukozyd kwercetyny	31,44	254, 266sh, 348	551*	550
6.	3-O-glukozyd kemferolu	33,43	263, 296sh, 347	449*, 447	448
7.	Kwas rozmarynowy	35,11	217, 288sh, 328	361*, 359	360
8.	3-O-(6"-malonylo)-glukozyd kemferolu	37,63	264, 294sh, 341	435*, 533	534

Wyniki oznaczania zawartości pochodnych kwasu kawowego oraz alantoiny w korzeniu żywokostu. Identyfikację związków przeprowadzono w oparciu o widma UV, MS i dane literaturowe: Trifan A, Skalicka-Wozniak K, Granica S i wsp. *Symphytum officinale* L.: Liquid-liquid chromatography isolation of caffeic acid oligomers and evaluation of their influence on pro-inflammatory cytokine release in LPS-stimulated neutrophils, w: *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 262(15) (2020).
*Zawartość alantoiny oznaczono metodą densytometrii-TLC wg K. Kimel, B. Spazak-Stefanowska, M. Krauze-Baranowska. TLC-densitometric analysis of allantoin in *Symphytum officinale* L. roots, w: *Acta Pharmaceutica*, Vol. 70 (2020) pp. 101-110

IZOLACJA I IDENTYFIKACJA GLOBOIDNANU A

Izolacja związku z wykorzystaniem automatycznego systemu SPE (SmartPrep, Horizon):

1 ml wyciągu z korzenia żywokostu (1g/8ml, 30% MeOH)

Aplikacja:

Kolumna: DSC-18 (1 g, 6 ml)

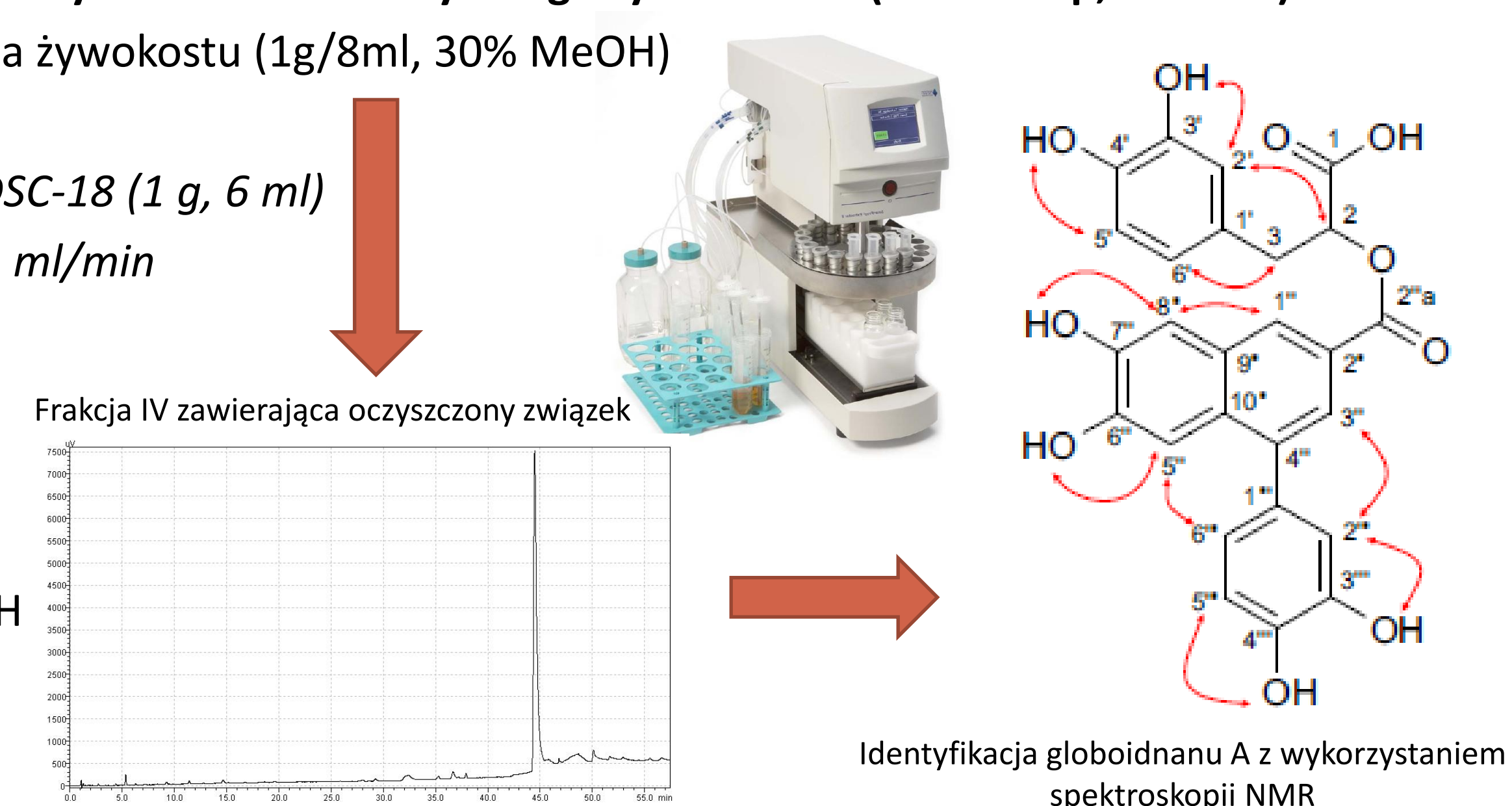
Przepływ: 1 ml/min

Frakcje:

I-III – 2 ml 30% MeOH

IV-VI – 2 ml 50% MeOH

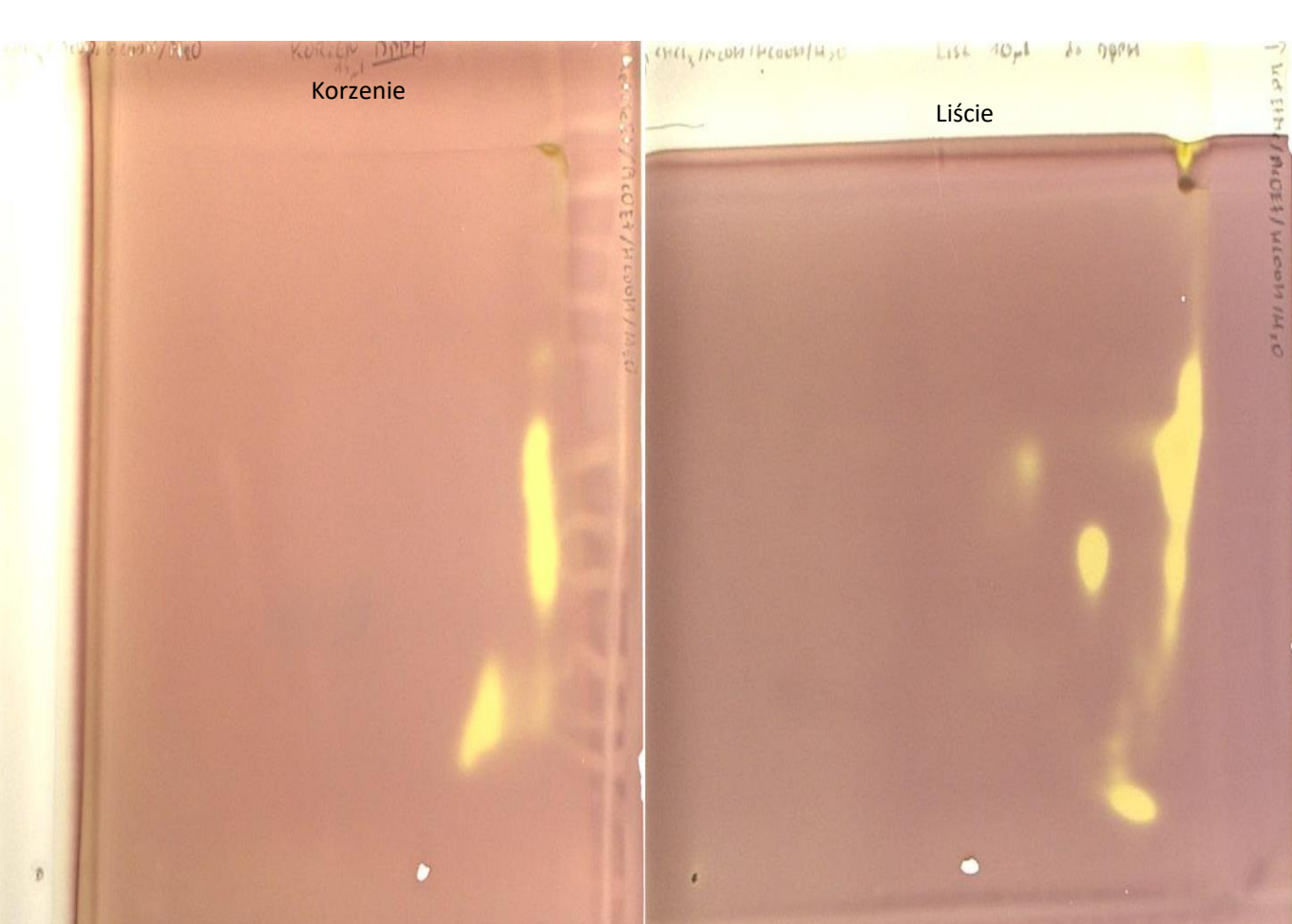
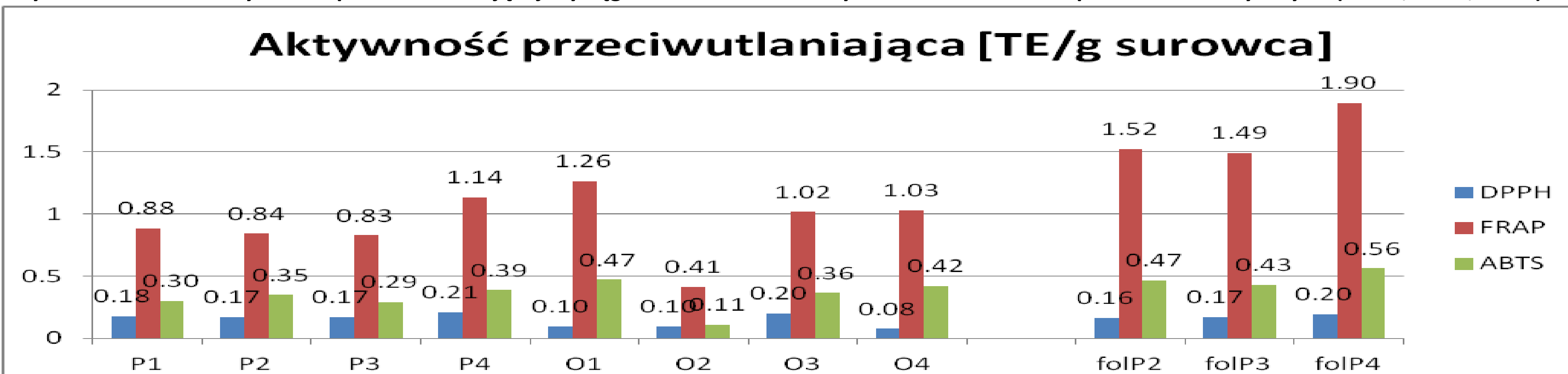
VII – 6 ml MeOH



Identyfikacja globoidnanu A z wykorzystaniem spektroskopii NMR

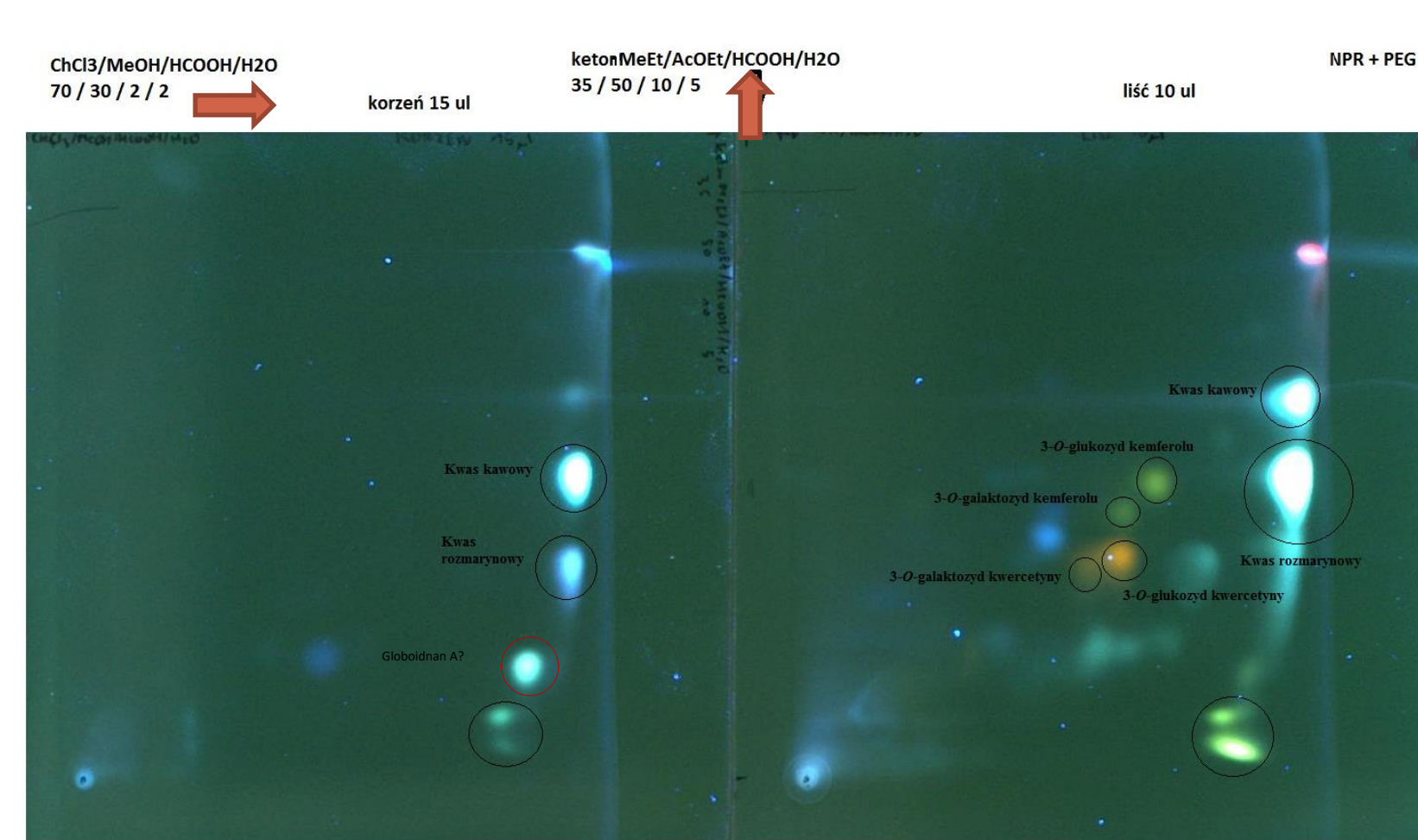
ANALIZA AKTYWNOŚCI PRZECIWPALNEJ I PRZECIWPALNEJ KORZENIA I LIŚCI ŻYWOKOSTU

Wyniki oznaczania aktywności przeciwutleniającej wyciągów z korzenia i liści żywokostu metodami spektrofotometrycznymi (DPPH, FRAP, ABTS):



Bioautografia-TLC – test DPPH

Ocena zdolności związków do wymiatania wolnych rodników (aktywność przeciwutleniająca)



Bioautografia-TLC: układ ryboflawina-światło-NBT (ocena aktywności przeciwutleniającej)

test hamowania oksydazy ksantynowej (ocena aktywności przeciwzapalnej)

PODSUMOWANIE

Przeprowadzono analizę jakościową i ilościową związków biologicznie czynnych obecnych w korzeniu żywokostu: alantoiny metodą densytometrii-TLC i pochodnych kwasu kawowego z wykorzystaniem HPLC-DAD-UV/Vis – kwasu kawowego, rozmarynowego oraz globoidnanu B i A. Obecność globoidnanu A potwierdzono w krajowych surowcach (liściach i korzeniu) – m. in. poprzez jego izolację z wykorzystaniem zautomatyzowanej metody SPE oraz analizę widm MS i NMR (1D i 2D). Ponadto, metodą HPLC-DAD-ESI/MS po raz pierwszy wykazano w liściu żywokostu obecność glikozydoestrów flawonoidowych – 3-O-(6"-malonylo)-glukozydów kemferolu i kwercetyny obok 3-O-glukozydów i 3-O-galaktozydów kemferolu i kwercetyny. Aktywność przeciwutleniającą i przeciwzapalną analizowanych wyciągów oznaczono metodami spektrofotometrycznymi (DPPH, ABTS, FRAP) oraz bioautografii-TLC (DPPH, układ ryboflawina-światło-NBT i test hamowania oksydazy ksantynowej).

