

Obsahové látky *Lilium candidum* L. a ich antioxidačná aktivita

MUČAJI P., HALADOVÁ M., EISENREICHOVÁ E., ŠERŠEŇ F¹., UBIK K²., GRANČAI D.
Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislavě, Katedra farmakognózie a botaniky, SR

¹Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislavě, Chemický ústav, SR

²Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, Praha

Došlo: 21. listopadu 2006 / Přijato: 30. listopadu 2006

SÚHRN

Obsahové látky *Lilium candidum* L. a ich antioxidačná aktivita

Predložená práca zhŕňa výsledky separácie a identifikácie flavonolového glykozidu z kvetov *Lilium candidum* L. a antioxidačných vlastností etanolového extraktu kvetov a vybraných látok izolovaných z tohto rastlinného druhu. Chromatografickými deliacimi metódami sa získal flavonoid, ktorý bol na základe výsledkov chromatografickej analýzy, teploty topenia, UV spektrofotometrie, kyslej hydrolyzy a hmotnostnej spektrometrie identifikovaný ako izoramnetín-3-O-rutinozid (narcisín), ktorého prítomnosť nebola doteraz v tomto rastlinnom druhu opísaná. Antioxidačná aktivita etanolového extraktu a látok izolovaných z *Lilium candidum* L. bola stanovená metódou vychytávania DPPH radikálov.

Kľúčové slová: *Lilium candidum* L. – izoramnetín-3-O-rutinozid – DPPH – antioxidačná aktivita

Čes. slov. Farm., 2007; 56, 27–29

SUMMARY

Constituents of *Lilium candidum* L. and their antioxidative activity

The paper deals with the separation and identification of a flavonoid glycoside from the petals of *Lilium candidum* L. and the antioxidative properties of the ethanolic extract of the flowers and selected compounds isolated from this species. The isolated flavonoid glycoside was identified as isorhamnetin-3-O-rutinoside by acid hydrolysis, TLC comparison with authentic samples, and UV and mass spectra. Isorhamnetin rutinoside was isolated from *Lilium candidum* L. for the first time. The antioxidative activity of the ethanolic extract of the flowers and some isolated compounds were determined using DPPH assays.

Key words: *Lilium candidum* L. – isorhamnetin-3-O-rutinoside – DPPH – antioxidative activity

Čes. slov. Farm., 2007; 56, 27–29

Má

Úvod

Lilium candidum L. (ľalia biela), čeľaď *Liliaceae* je trváca bylina oddávna používaná v ľudovom liečiteľstve na zapálené a hnisajúce rany a ako súčasť kozmetických prípravkov. Predmetom zberu sú aj dnes kvety a cibule, ktorých liehové a olejové extrakty majú adstringentné a protizápalové pôsobenie, urýchľujú granuláciu a čistenie zahnisaných rán a sú vhodné na popáleniny menšie-

ho stupňa a rozsahu. Používajú sa pri akné, opuchoch, dermatitídach a pri zápale nechtového lôžka (panarícium) ¹⁾. V posledných rokoch sa dokázal ich inhibičný účinok na lipoxigenázu ²⁾ ako aj protiplesňová ³⁾ a protinádorová aktivita ⁴⁾. Z obsahových látok tohto rastlinného druhu boli doteraz izolované viaceré organické kyseliny, flavonoidy, dusíkaté a steroidné zlúčeniny ⁵⁾.

Zápal a peroxidácia lipidov zohrávajú dôležitú úlohu v patogenéze rôznych ochorení. Peroxidácia lipidov je

Adresa pro korespondenci:

doc. PharmDr. Pavel Mučaji, PhD.
Katedra farmakognózie a botaniky FaF UK
Odbojárov 10
832 32 Bratislava
e-mail: mucaji@fpharm.uniba.sk

spôsobená účinkom voľných radikálov a reaktívnych foriem kyslíka, kým pri vzniku zápalu sa podieľajú svojou činnosťou aj niektoré enzýmy (lipoxigenáza, cyklooxigenáza) ⁶⁾. Preto v súčasnosti stále väčší význam nadobúda hľadanie nových látok s antioxidačným účinkom alebo inhibičným pôsobením na spomínané enzýmy a predstavuje tak dôležitý východiskový bod pri skúmaní nových možností, ktoré by sa mohli uplatniť v liečbe alebo prevencii týchto ochorení.

Predložená práca zhŕňa výsledky separácie a identifikácie izoramnetín-3-*O*-rutinozidu z kvetov lalie bielej a antioxidačných vlastností etanolového extraktu kvetov a vybraných látok izolovaných z tohto rastlinného druhu hodnotených metódou vychytávania stabilných DPPH radikálov.

POKUSNÁ ČASŤ

Použitý rastlinný materiál a metódy

Na izoláciu obsahových látok sa použili čerstvé kvety *Lilium candidum* L. (1710 g), ktoré sa viacnásobne macerovali 96%-ným a 70%-ným etanolom. Po odparení rozpúšťadla na vákuovej odparke sa získalo 178,3 g etanolového macerátu, ktorý sa extrahoval *n*-butylalkoholom a vodou (1:1). Butanový extrakt (64,82 g) sa delil na stĺpci silikagélu (SILPEARL, Kavalier Votice) a Sephadex LH-20 (Pharmacia Uppsala). Na tenkovrstvovú chromatografiu sa použili silikagélové fólie SILUFOL UV 254 (Kavalier) a silikagélové platničky Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Na detekciu chromatogramov boli použité UF žiarenie pri 254 nm, NST/PEG skúmadlo, kyselina sírová v éteri (1:4) a anilín-ftalát s následným zahriatím na 120 °C pripravené podľa literatúry ⁷⁾. Použitý štandard izoramnetínu bol od firmy C. Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Nemecko.

Hmotnostné spektrá boli merané na prístroji ZAB-EQ (VG Organic, Manchester UK). Teplota topenia bola meraná na Koflerovom bloku, ultrafialové spektrá na prístroji SPECORD UV VIS (Carl Zeiss, Jena) v metanole a za použitia diagnostických skúmadiel (metoxylát sodný, roztok chloridu hlinitého, kyselina chlorovodíková, octan sodný, kyselina boritá) podľa literatúry ⁸⁾. DPPH (α , α -difenyľ- β -pikryl-hydrazyl) použitý na stanovenie antioxidačnej aktivity bol od firmy Sigma-Aldrich, Švédsko.

Kyslá hydrolýza: 2 mg látky sa rozpustilo v MeOH (2 ml) a zahrievalo s 11% HCl (5 ml) počas 3 hodín na vodnom kúpeli pod spätným chladičom. Aglykón sa extrahoval z reakčnej zmesi etylacetátom a vodná fáza sa následne neutralizovala na iónomieniči (Dowex 2x8, Fluka, Nemecko) a porovnávala so štandardami pomocou tenkovrstvovej chromatografie (TLC) ⁹⁾.

DPPH test

Do metanolového roztoku (10^{-4} mol.l⁻¹) DPPH sa pridávalo rôzne množstvo študovaného extraktu (resp. izolátov) a pozoroval sa pokles intenzity absorpčného pásu DPPH pri 516 nm, ktorý je spôsobený vychytávaním DPPH radikálov. Antioxidačná (scavengerová) aktivita látok sa určuje z vychytávania DPPH radikálov a vypočíta podľa vzorca:

$$\text{scavenging activity (\%)} = [A_a - (A_b - A_c)] / A_a \times 100$$

A_a – absorbancia roztoku DPPH bez testovaných vzoriek

A_b – absorbancia zmesi testovanej látky a roztoku DPPH

A_c – absorbancia porovnávacieho roztoku bez DPPH

Z lineárnej časti koncentračnej závislosti poklesu intenzity tohto pásu bola vypočítaná hodnota SC₅₀ (scavenging concentration), t.j. taká koncentrácia antioxidantu, pri ktorej dochádza k poklesu spomínaného absorpčného píku na polovicu.

Extrakcia a izolácia látok

Butanový podiel (64,8 g) sa adsorboval na silikagél a delil stĺpcovou chromatografiou na silikagéli použitím elučnej sústavy CHCl₃:MeOH:H₂O v rôznom pomernom zastúpení. Celkovo sa zachytilo 282 frakcií (po cca 100 ml), ktoré boli spájané na základe TLC analýzy.

Opakovanou rechromatografiou frakcie 78–85 na Sephadex LH-20 a silikagéli a kryštalizáciou z metanolu sa získala jednotná látka bledožltej farby o hmotnosti 11 mg.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Izolovaná látka sa získala vo forme žltého prášku, ktorá tenkovrstvovou chromatografiou na silikagéli v sústave EtOAc:HCOOH:CH₃COOH:H₂O 100:11:11:23 vykazovala po detekcii NEU-ovým skúmadlom a PEG-4000 v UF žiarení jednu škvrnu o R_f hodnote 0,45. UF spektrá látky v metanole a po pridaní špecifických diagnostických skúmadiel (tab. 1) potvrdili jej flavonoidný charak-

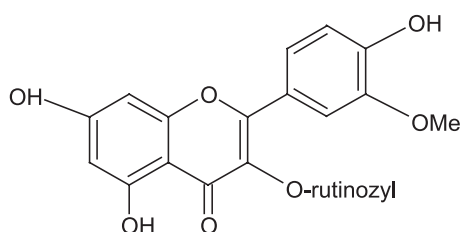
Tab. 1. UF spektrá izolovanej látky v metanole a po pridaní špecifických diagnostických skúmadiel

Skúmadlo	čas merania	vlnová dĺžka (nm)
MeOH	ihneď	227, 258, 271, 304 (ram), 361
NaOMe	ihneď	232, 273, 330, 410
NaOMe	po 5 minútach	232, 273, 330, 410
AlCl ₃	ihneď	227, 271, 304 (ram), 373 (ram), 406
AlCl ₃ +HCl	ihneď	227, 271, 304 (ram), 373 (ram), 406
NaOAc	ihneď	279, 320, 395
NaOAc	po 10 minútach	279, 320, 395
NaOAc+ H ₃ BO ₃	ihneď	236, 271, 304 (ram), 365

Tab. 2. R_f hodnoty štandardu izoramnetínu a aglykónu na TLC v rôznych sústavách

Aglykón + štandard	silikagél	
	R _f C ₆ H ₆ :EtOAc:HCOOH (7:3:1)	silikagél CHCl ₃ :MeOH (9:1)
izoramnetín	0,75	0,81

ter. Spektrá izolovanej látky ako aj zistená teplota topenia (179–182 °C) sa zhodovali s literárnymi údajmi izoramnetín-3-*O*-rutinozidu ^{10, 11)}. V hmotnostnom spektre (FAB-MS) látka vykazovala molekulový ión a fragmenty pri *m/z*: 625 [M+H]⁺, 317 [M-162-146+H]⁺. Kyslou hyd-



Obr. 1. Izorametín-3-O-rutinozid

rolýzou sa tenkovrstvovou chromatografiou porovnaním so štandardom dokázal izoramnetín ako aglykón (tab. 2). TLC porovnaním so štandardami na silikagéli v horeuvedenej sústave sa po 4-násobnom vyvíjaní a detekcii anilín ftalátom s následným zahriatím dokázala prítomnosť ramnózy (Rf=0,65) a glukózy (Rf=0,43).

Látky izolované z etanolového extraktu *Lilium candidum* L. použité v DPPH teste:

1. kempferol
2. izoramnetín-3-O-rutinozid
3. jatropham (5-hydroxy-3-metyl-3-pyrolín-2-ón)
4. jatropham 5-O-β-D-glukopyranozid
5. (25S)-3β-[[β-D-glukopyranozyl-(1→4)-[L-ramnopyranozyl-(1→2)]-β-D-glukopyranozyloxy] spirost-5-én-27-ol
6. 5-hydroxy-3metyl-1-(3-metyl-2-oxo-3-pyrolín-5-yl)-3-pyrolín-2-ón
7. 5,5-oxydi-(3-metyl-3-pyrolín-2-ón)
8. Fenyletylpalmitát
9. 2-fenyletyl α-L-arabinopyranozyl-(1→6)-β-D-glukopyranozid
10. Kyselina metyljantárová
11. 96% EtOH extrakt kvetov ľalie bielej

Z výsledkov antioxidačnej aktivity vyplýva (tab. 3), že najúčinnnejšou testovanou zlúčeninou je flavonoid kempferol, s hodnotou SC₅₀ 6,2 μg/ml porovnateľnou hodnotou použitého štandardu kyseliny askorbovej SC₅₀ 2,21 μg/ml. V teste DPPH mal kempferol až stonásobne vyššiu antioxidačnú aktivitu v porovnaní s izoramnetín rutinozidom, čo je v súlade s literatúrou ¹²⁾ a poznatkami, že aglykóny flavonoidov majú vyššiu antioxidačnú aktivitu ako flavonoidné glykozidy. Ostatné študované látky izolované z tejto rastliny vykazovali iba slabú antioxidačnú aktivitu hodnotenú touto metódou.

Pri sledovaní účinku jednotlivých izolovaných látok na aktivitu sójovej lipoxigenázy a lipoxigenázy izolovanej z cytozolovej frakcie pľúc potkana sa zistil koncentračne závislý inhibičný účinok jednotlivých látok, pričom najúčinnnejším inhibítorom bol kempferol ²⁾. Preukázaný bol aj inhibičný účinok kempferolu na aktivitu enzýmov cyklooxygenázy-1 (COX-1) a cyklooxygenázy-2 (COX-2). Kempferolom navodená inhibícia COX-1 je koncentračne závislá s 94,1% inhibíciou pri koncentrácii 80 μg/ml, resp. 78,5% inhibíciou pri polovičnej koncentrácii. Pri pokusoch s COX-2 bola pri použitých koncentráciách zistená 37% inhibícia pri použití vyššej z uvedených koncentrácií ⁶⁾.

Mnohé štúdie dokazujú, že polyfenoly a flavonoidy sa

Tab. 3. Hodnoty SC₅₀ vybraných látok izolovaných z *Lilium candidum* L.

Vzorka	SC ₅₀ (μg/ml)	r ²
1	6,2	0,998
2	609	0,951
3	962	0,984
4	1040	0,984
5	658	0,931
6	694	0,992
7	1357	0,957
8	1570	0,957
9	917	0,984
10	647	0,992
11	369	0,992
vitamín C	2,21	0,998

r²-hodnoty strednej kvadratickej odchýlky

vyznačujú antioxidačnými, protizápalovými a ďalšími biologickými účinkami, ktoré priaznivo ovplyvňujú zdravie ľudí. Naše výsledky poukazujú, že vysoký obsah týchto látok v okvetných lístkoch ľalie bielej (2,68 % fenolových látok, 1,58 % flavonoidov) ¹³⁾ opodstatňuje použitie tejto rastliny v ľudovom liečiteľstve.

Práca vznikla za podpory grantových projektov VEGA 1/4289/07 a 1/3411/06.

LITERATÚRA

1. Kresánek, J. et al.: Príručný atlas liečivých rastlín. Martin, Osveta, 1985, s. 99.
2. Bezáková, L., Mučaji, P., Eisenreichová, E. et al.: Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae, 2004; 51, 38-44.
3. Mučaji, P., Hudecová, D., Haladová, M., Eisenreichová, E.: Čes. slov. Farm., 2002; 51, 297-300.
4. Vacháľková, A., Eisenreichová, E., Haladová, M. et al.: Neoplasma, 2000; 47, 313-318.
5. Eisenreichová, E., Haladová, M., Mučaji, P., Grančai, D.: Acta Facult. Pharm. Univ. Comenianae, 2004; 51, 27-37.
6. Francis, J. A., Rumbeiha, W., Nair, M. G.: Life Sciences, 2004; 76, 671-683.
7. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. Darmstadt, Merck, 1976, s. 118.
8. Mabry, T. J. et al.: The Systematic identification of flavonoids. New York, Springer-Verlag, 1970, s. 42-61.
9. Friedrich, H.: Arch. Pharm., 1962; 295, 59-66.
10. Mabry, T.J. et al.: The systematic identification of flavonoids. New York, Springer-Verlag 1970, s. 140.
11. Devon, T. K. et al.: Handbook of naturally occurring compounds. Volume I. Acetogenins, shikimates and carbohydrates. London, Academic Press Inc., 1975, s. 541.
12. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G.: Free Radic. Biol. Med., 1996; 20, 933-956.
13. Mučaji, P., Haladová, M., Eisenreichová, E.: Farm.Obzor, 2006; 75, 10-13.