

PŮVODNÍ PRÁCE

Fenylpropanoidy a flavonoid z *Helichrysum petiolare***Hilliard & B. L. Burt****Phenylpropanoids and flavonoid from *Helichrysum petiolare*****Hilliard & B. L. Burt****Renata Kubínová • Marcela Nejezchlebová • Markéta Gazdová • Mária Gáborová • Ivana Várady • Lenka Molčanová**

Došlo 23. září 2021 / Přijato 4. listopadu 2021

Souhrn

Fytochemická analýza methanolickeho extraktu *Helichrysum petiolare* Hilliard & B. L. (Asteraceae) prokázala přítomnost sekundárních metabolitů patřících mezi fenylpropanoidy a flavonoidy. Pomocí preparativní HPLC se podařilo vyizolovat pět obsahových látek: kumarin skopolin (1), kyselinu 3-chlorogenovou (2), glukosidicky vázaný derivát kyseliny kávové (3), kyselinu dikafeoylchinovou (5) a flavonoid isokvercitrin (4). V druhu *H. petiolare* byly tyto sloučeniny identifikovány poprvé. Při testování antibakteriální aktivity bylo zjištěno, že pouze kyselina dikafeoylchinová vykazuje mírnou antibakteriální aktivitu proti *Escherichia coli* CCM 7929 v koncentraci 512 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Klíčová slova: *Helichrysum petiolare* • HPLC • rostlinné fenoly • antibakteriální aktivita

Summary

The phytochemical analysis of a methanolic extract from *Helichrysum petiolare* Hilliard & B. L. (Asteraceae) confirmed the content of phenylpropanoids and

flavonoids. Five secondary metabolites were isolated using preparative HPLC, namely coumarin scopolin (1), 3-chlorogenic acid (2), caffeic acid-hexose derivative (3), dicaffeoylquinic acid (5), and the flavonoid isoquercitrin (4). These compounds were identified from this species for the first time. Only dicaffeoylquinic acid was able to inhibit *Escherichia coli* CCM 7929 at the concentration of 512 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ in a screening of antibacterial activity.

Key words: *Helichrysum petiolare* • HPLC • plant phenols • antibacterial activity

Úvod

Druhy rodu *Helichrysum* Mill. se objevují jako okrasné rostliny v Evropě, hojně jsou rozšířené v jihozápadní Asii a v Austrálii, nicméně v nejvyšší počtu se vyskytují v jižní Africe, včetně Madagaskaru¹⁾. Pro svoje antibakteriální a antiflogistické účinky se v lidovém léčitelství využívají zejména listy a kořen ve formě nálevů a odvarů při léčbě různých infekcí respiračního a trávicího traktu. Extrakty lze využít i zevně ve formě mastí na špatně se hojící rány²⁾.

Rostliny rodu *Helichrysum* jsou zdrojem celé řady bioaktivních látek. Jde zejména o fenolické kyseliny (kyselina kávová, kyselina chlorogenová, kyselina ferulová), flavonoidy, kumariny, florigluciny a pyrony³⁾. Druh *H. petiolare*, který zařazujeme mezi jihoafrické druhy, obsahuje hlavně silici bohatou na seskviterpeny, z nadzemních částí byl dále vyizolován chalkon 2',6'-dihydroxy-4'-metoxychalkon, flavonoid 5-hydroxy-7,8-dimetoxyflavon, pyron ocimepyron a acylfloriglucinol humulonmetyléter⁴⁾.

Některé fenolické sloučeniny jsou v rostlině syntetizovány ve větší míře jako reakce na patogenní agens při poranění, velmi často jsou pak kumulovány v tomto místě, a brání tak poškozenou část a v konečném důsledku celou rostlinu před infekcí. V řadě studií bylo prokázáno, že rostlinné fenoly včetně flavonoidů, kumarinů a fenolických kyseliny vykazují antibakteriální aktivitu⁵⁾. Vzhledem

doc. PharmDr. Renata Kubínová, Ph.D. (✉) • M. Gazdová •

M. Gáborová • L. Molčanová

Masarykova univerzita, Veterinární a farmaceutická univerzita

Farmaceutická fakulta, Ústav přírodních léčiv

Palackého 1/3, 612 42 Brno

e-mail: kubinovar@pharm.muni.cz

I. Várady

Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Ústavní lékárna

M. Nejezchlebová

Masarykova univerzita Brno, Veterinární a farmaceutická univerzita

Farmaceutická fakulta, Ústav molekulární farmacie

k využití rostlin rodu *Helichrysum* v lidovém léčitelství, byly izolované sloučeniny podrobeny testování antibakteriální aktivity s využitím mikroorganismu *Escherichia coli*. Jde o gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterii nacházející se v intestinálním traktu člověka, nicméně některé virulentnější kmeny mohou být příčinou závažných onemocnění, zejména močového a trávicího systému⁶.

Testované látky byly vyizolovány z methanolického extraktu *H. petiolare* pomocí preparativní HPLC a identifikovány pomocí spektrálních metod (UV, IČ, MS) a nukleární magnetické rezonance (NMR).

Pokusná část

Chemikálie a roztoky

Acetonitril CHROMASOLVTM pro HPLC, ≥ 99,9 % (Honeywell – Riedel de Haën, SRN), kyselina mravenčí p. a., ≥ 98 % (Honeywell – Fluka, SRN), voda pro HPLC deionizovaná (Milli-Q, Millipore, USA), methylalkohol p.a. (Penta, ČR), dimethylsulfoxid, ≥ 99,9 % (Sigma – Aldrich, USA), živné médium s 1% peptonem M244 (HiMedia, ČR)

Přístroje a zařízení

HPLC/DAD/ESI-MS HP Agilent 1100 (Hewlett-Packard, USA) s kolonou Ascentis Express RP-AMIDE (10 cm × 2,1 mm × 2,7 μm) v analytickém módu a Ascentis RP-AMIDE (25 cm × 10 mm × 5 μm) v preparativním módu, rotační vakuová odparka (Büchi Labortechnik, Švýcarsko), lyofilizátor Alpha 1-2LD (Martin Christ GmbH, SRN), mikrodestičkový reader UV/VIS – SPECTROstar[®] Omega (BMG Labtech, SRN), NMR Jeol JNM-ECZ400R 400 MHz (Jeol, USA), IČ spektrometer Nicolet Impact 410 FTIR (Thermo Scientific, USA).

Rostlinný materiál a příprava extraktu

Nadzemní části *H. petiolare* nasbírané v říjnu 2014 byly hned po sběru zamrazeny na teplotu –60 °C. Před použi-

tím bylo 1,3 kg materiálu rozdrobněno na velikost vhodnou pro extrakci a extrahováno methanolem v poměru 1 : 20 (m/V). Extrakce probíhala při teplotě místnosti (25 °C) 24 hodin. Po filtraci byl extrakt odpařen na rotační vakuové odparce do sirupovité tekutiny, která byla lyofilizována. Na izolaci obsahových látek byl použit 1 g lyofilizátu, který byl rozpuštěn v 5 ml methanolu.

HPLC metody

Pro analýzu extraktu a izolovaných látek byla využita gradientová eluce: acetonitril (0 min 10,0 %, 36 min. 100 %) a 40 mM kyselina mravenčí (0 min 90 %, 36 min 0 %), nástřik 1 μl, průtok 0,3 ml · min⁻¹, teplota kolony 40 °C. UV detekce při 350 nm, hmotnostní detekce s elektrosprejovou ionizací (ESI/MS). Při preparativní HPLC byla využita stejná gradientová eluce s nástřikem 30 μl a průtokem 4 ml · min⁻¹.

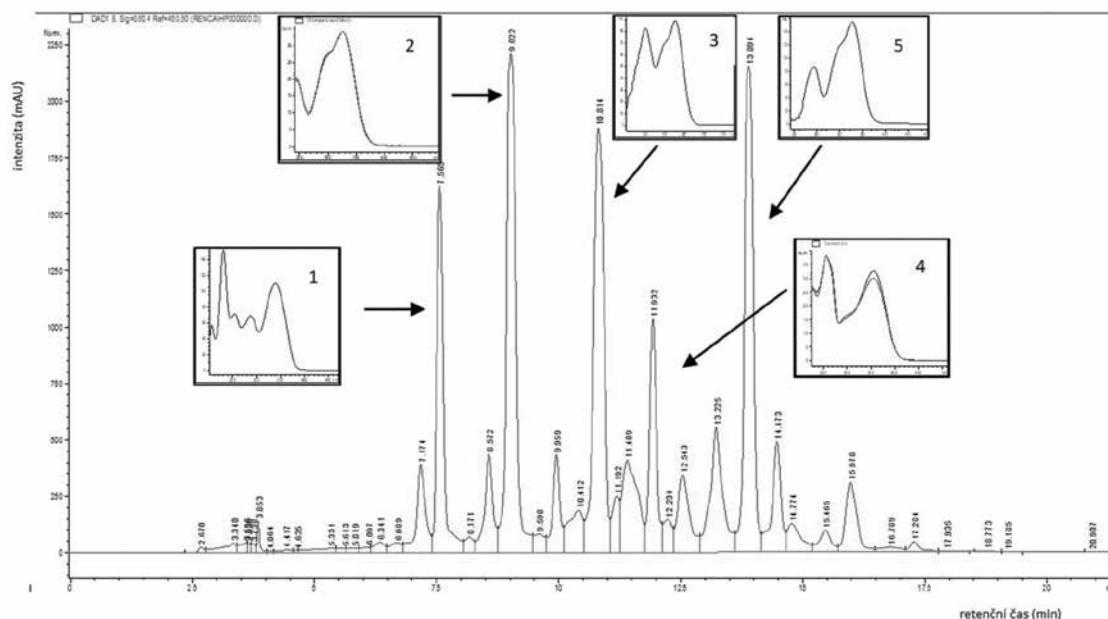
Stanovení antibakteriální aktivity⁷

Do jamky na mikrotitrační destičce bylo napipetováno 80 μl kultivačního média a 20 μl testované látky rozpouštěné v DMSO a naředěné médiem (512 μg · ml⁻¹, max. 5 % DMSO). Následně bylo provedeno naočkování referenčním kmenem *Escherichia coli* CCM 7929. Kultivace probíhala 24 hodin při teplotě 37 °C. Vyhodnocení bylo založeno na měření absorbance v jednotlivých jamkách (A_{vzorku}) při vlnové délce 600 nm. Stanovení bylo prováděno ve třech opakováních, kontrolní vzorek (A_{kontrola}) obsahoval jen kultivační médium s mikroorganismem (kontrola) a slepý pokus (A_{blank}) jen kultivační médium. Růst bakterií v % byl vypočítán podle vzorce:

$$[(A_{\text{vzorku}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{kontrola}}] \times 100$$

Výsledky a diskuze

Fytochemická analýza methanolického extraktu *H. petiolare* prokázala přítomnost pěti dominantních obsa-



Obr. 1. HPLC analýza methanolického extraktu *H. petiolare* s UV spektry dominantních látek

hových látek (obr. 1), které byly vyizolovány pomocí preparativní HPLC. UV spektrum látky **1** vykazuje zřetelná maxima při 230 nm, 290 nm a 340 nm. Na IČ spektru je vidět široký pás charakteristický pro hydroxylové skupiny ($3750\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$), vibrace C=O skupiny (1716 cm^{-1}), látka má aromatický charakter (pásky $1650\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$) a velmi výrazná je také vibrace C-O-C vazby (1076 cm^{-1}). Může se tedy jednat o glykosid. V MS spektru v pozitivním módu je patrný molekulární iont $[M+H]^+$ v m/z 355. Pomocí NMR analýzy byla látka na základě srovnání s literaturou identifikována jako kumarin skopolin⁸. V rodu *Helichrysum* byl skopolin detegovaný v druhu *H. arenarium*⁹.

Na základě srovnání UV spektra s knihovnou spekter byla látka **2** identifikována jako kyselina 3-chlorogenová (kyselina 3-O-kafeoylchinová). To bylo potvrzeno společným nástřikem se standardem a MS analýzou, kdy v negativním módu je patrný molekulární iont $[M-H]^-$ v m/z 353 s následným fragmentem v m/z 191, což odpovídá iontu kyseliny chinové¹⁰. V druzích rodu *Helichrysum* je kyselina 3-chlorogenová běžná².

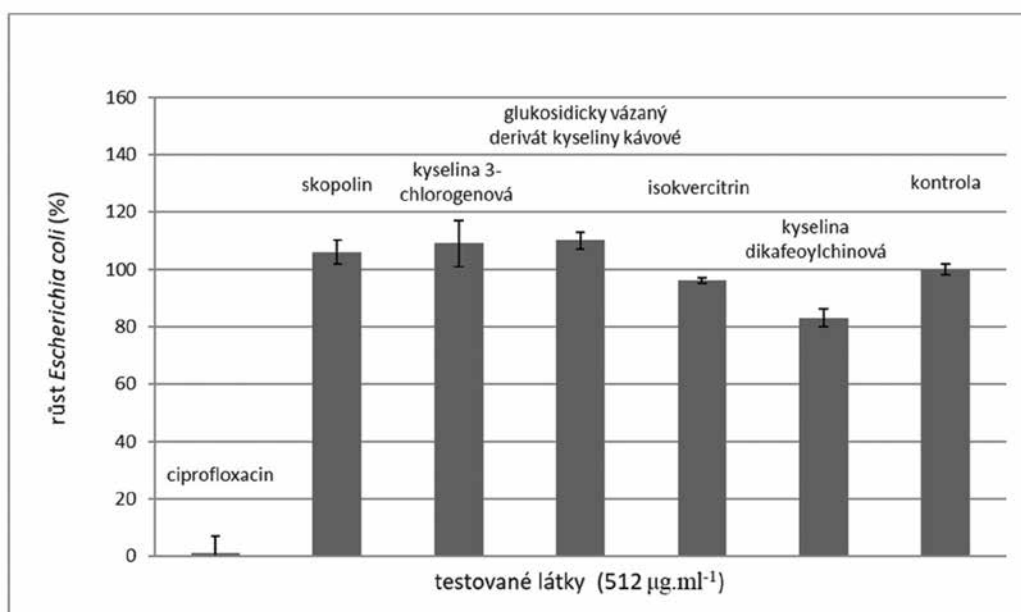
Látka **3** vykazuje na UV spektru absorpční maxima při 250 nm a 325 nm s ramenem při 295 nm. Podle IČ spektra jde o látku s hydroxylovými skupinami (vibrace $3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$), karboxylové skupině by mohl odpovídat pás okolo 1600 cm^{-1} . Vazbu C-O-C signalizuje široký pás při 1066 cm^{-1} . V negativním módu je patrný iont $[M-H]^-$ v m/z 449. Při MS/MS fragmentaci jsou patrné fragmenty štěpení kyseliny kávové¹¹. Bohužel látka nebyla izolována v dostatečném množství, aby mohla být dokončena NMR analýza. Z NMR spektra lze potvrdit, že jde o derivát kyseliny kávové s navázanou glukózou.

Na základě srovnání UV spektra s knihovnou spekter byla látka **4** identifikována jako isokvercitrin, což bylo prokázáno společným nástřikem se standardem a MS analýzou, kdy v negativním módu je patrný molekulár-

ní iont $[M-H]^-$ v m/z 463. Tento flavonoid s antioxidační aktivitou se podílí na biologickém účinku extraktů rostlin rodu *Helichrysum*³.

Látka **5** má velmi podobné UV i IČ spektrum jako látka **2** a **3**, v MS spektru je pak molekulární iont $[M-H]^-$ v m/z 515. V MS/MS fragmentaci jsou následně fragmenty v m/z 353, 335, 191, 179, 173, 135, což je charakteristické pro dikafeoylchinový derivát. Kyseliny dikafeoylchinové jsou běžné v druzích rodu *Helichrysum*, v portugalském endemitu *H. devium* byly identifikovány kyselina 1,3-O-dikafeoylchinová, kyselina 3,4-O-dikafeoylchinová, kyselina 1,5-O-dikafeoylchinová a kyselina 3,5-O-dikafeoylchinová. V *H. obconicum* byly identifikovány ještě další dvě kyseliny, kyselina 4,5-O-dikafeoylchinová a kyselina 1,4-O-dikafeoylchinová¹². Podle MS fragmentace, retenčního času a na základě srovnání s literaturou by mohlo jít o kyselinu 4,5-O-dikafeoylchinovou¹³, nicméně pro konečnou identifikaci by bylo potřebné změřit NMR spektrum. Látka však byla vyizolována v množství pouze 2 mg, nebylo tedy možné využít tuto metodu.

V rámci testování biologické aktivity byla otestována antimikrobiální aktivita izolovaných látek na referenční kmen *Escherichia coli* CCM 7929 metodou měření optické hustoty při 600 nm (obr. 2). Bylo prokázáno, že kyselina dikafeoylchinová (**5**) vykazovala mírnou antibakteriální aktivitu proti *Escherichia coli*. V koncentraci $512\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ omezila růst na 83 % oproti kontrole, která představuje 100% růst. Nejvyšší aktivitu vykazoval standard antibiotikum ciprofloxacin, který téměř kompletně inhiboval růst *E. coli*. V literatuře byl studován mechanismus účinku¹⁴. Vnější membrána gramnegativních bakterií se skládá z lipopolysacharidů a proteinů, které jsou vázány elektrostatickými interakcemi s ionty dvojmocných kovů. Aniontové sloučeniny jsou schopné odstraňovat dvojmocné kationty z jejich



Obr. 2. Inhibiční aktivita izolovaných látek vůči *E. coli* v koncentraci $512\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

vazebných míst v lipopolysacharidové vrstvě, a tak narušovat jejich integritu. Kafeoylchinové kyseliny se vzhledem ke svému negativně nabitému povrchu mohou vázat na vnější membránu, chelátovat dvojmocné kationty (Mg^{2+}) a tím narušovat její integritu. To vede ke ztrátě její funkce. Interagují také s cytoplazmatickou membránou, zvyšují její permeabilitu a způsobují iontovou dysbalanci¹⁴). Nicméně podle našich výsledků byla účinná pouze kyselina dikafeoylchinová (**5**), což můžeme přičítat některým výhodnějším fyzikálně-chemickým parametrům molekuly, zejména její vyšší hydrofobicitě a tím lepší penetraci membránou. Antibakteriální aktivita dikafeoylchinových kyselin je pak ovlivněna pozicí esterů kyseliny kávové na cykloxanovém kruhu. Nejvýhodnější je poloha 5, nutná je také určitá vzdálenost mezi oběma estery¹⁵).

H. petiolare je u nás hojně rozšířená balkónová rostlina, nicméně v jižní Africe, zejména v oblasti Jihoafrické republiky a Namibie patří mezi nejvýznamnější léčivé rostliny¹⁶). Užívá se při zánětech horních cest dýchacích, infekcích močových cest a jako zevní antiseptikum, zejména pro obsah silice bohaté na terpenoidy. V naší studii jsme v extraktu identifikovali obsahové látky ze skupiny polyfenolů, které se v menší míře také mohou podílet na antibakteriální a antiflogistické aktivitě, pro kterou se rostlina v lidovém léčitelství užívá.

Rukopis vznikl na základě diplomové a rigorózní práce PharmDr. Ivany Várady, rozené Džubinské, které obhájila na Farmaceutické fakultě VFU Brno v letech 2017 a 2019.

Konflikt zájmů: žádný.

Literatura

1. **Lourens A. C. U., Viljoen A. M., van Heerden F. R.** South African *Helichrysum* species: A review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry, *J. Ethnopharmacol.* 2008; 119, 630–652.
2. **Albayraka S., Aksoy A., Sagdic O., Hamzaoglu E.** Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (*Asteraceae*) species collected from Turkey. *Food Chem.* 2010; 119, 114–122.
3. **Czinner E., Hagymási K., Blázovics A., Kéry A., Szöke E., Lemberkovics E.** In vitro antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 73, 437–443.
4. **Jakupovic J., Zdero C., Grenz M., Tschritzis F., Lohmann L., Hashemi-Nejad S. M., Bohlmann F.** Twenty-one acylphloroglucinol and further constituents from South African *Helichrysum* species. *Phytochem.* 1989; 28, 1119–1131.
5. **Ncube N. S., Afolayan A. J., Okoh A.** Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: Current Methods and Future Trends. *African J. Biotechnol.* 2008; 7, 1797–1806.
6. **Abdelhamid A. G., Essam A., Hazza M.M.** Cell free preparations of probiotics exerted antibacterial and antibiofilm activities against multidrug resistant *E. coli*. *Saudi Pharm. J.* 2018; 26, 603–607.
7. **Schwalbe R., Steele-Moore L., Goodwin A. C.** Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. CRC Press 2007, 75–79.
8. **Bayoumi S. A. L., Rowan M. G., Blagbrough I. S., Beeching J. R.** Biosynthesis of scopoletin and scopolin in cassava roots during post-harvest physiological deterioration: The *E-Z*-isomerisation stage. *Phytochemistry* 2008; 69, 2928–2936.
9. **Morikawa T., Wang L.-B., Nakamura S., Ninomiya K., Yokoyama E., Matsuda H., Muraoka O., Wu L.-J., Yoshikawa M.** Medicinal flowers. New flavanone and chalcone glycosides, Arenariumosides I, II, III, and IV, and tumor necrosis factor- α inhibitors from Everlasting, flowers of *Helichrysum arenarium*. *Chem. Pharm. Bull.* 2009; 57, 361–367.
10. **Clifford M. N., Johnston K. L., Knight S., Kuhnert N.** Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51, 2900–2911.
11. **Wu Z.-J., Ma X.-L., Fang D.-M., Qi H.-Y., Ren W.-J., Zhang G.-L.** Analysis of Caffeic Acid Derivatives from *Osmanthus Yunnanensis* Using Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2009; 15, 415–429.
12. **Gouveia S. C., Castilho P. C.** Characterization of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC-DAD(-)-ESI-MSn method. *Food Chemistry* 2011; 129, 333–344.
13. **Carlotto J., da Silva L. M., Dartora N., Maria-Ferreira D., de A. Sabry D., Filho A. P. S., de Paula Werner M. F., Sasaki G. L., Gorin P. A. J., Iacomini M., Cipriani T. R., de Souza L. M.** Identification of a dicaffeoylquinic acid isomer from *Arctium lappa* with a potent anti-ulcer activity. *Talanta* 2015; 135, 50–57.
14. **Lou Z., Wang H., Zhu S., Ma Ch., Wang Z.** Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *J. Food Sci.* 2011; 76, 398–403.
15. **Han J., Lv Q. Y., Jin S. Y., Zhang T. T., Jin S. X., Li X. Y., Yuan H. L.** Comparison of anti-bacterial activity of three types of di-O-caffeoylquinic acids in *Lonicera japonica* flowers based on microcalorimetry. *Chin. J. Nat. Med.* 2014; 12, 108–113.
16. **Scott G., Springfield E. P., Coldrey N.** A pharmacognostical study of 26 South African plant species used as traditional medicines. *Pharm. Biol.* 2004; 42, 186–213.