

XANTHIUM SPINOSUM L. – FYTOCHEMICKÁ STUDIE

KLEČÁKOVÁ- KARLÍČKOVÁ J., JAHODÁŘ L.

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

SOUHRN

Xanthium spinosum L. – fytochemická studie

Práce se zabývá izolací obsahových látek *Xanthium spinosum* L. a určení biologické aktivity (toxicity). Taxon vyskytující se také v naší flóře nebyl dosud z tohoto pohledu studován. Použitá metodika má charakter „bioassay-guided separace“. Jako základní biologický test byl použit Tubifex tubifex test (TT test). Z methanolového extraktu natě byl vyizolován ent-kauranový diterpen atraktylosid, z acetonového extraktu byly vyizolovány dva deriváty xanthanolidů – seskviterpenických laktónů: xanthumin a deacetyl-xanthumin a z ethanolového extraktu fytosteroly: β -sitosterol a stigmasterol. Z acetonového extraktu plodů byly získány mastné kyseliny.

Klíčová slova: *Xanthium spinosum* L. – Asteraceae – bioassay-guided separace – atraktylosid – xanthanolidy – Tubifex tubifex test

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 141–144

SUMMARY

Xanthium spinosum L. – a Phytochemical Study

The paper deals with the isolation of the constituents of *Xanthium spinosum* L. and the determination of its biological activity (toxicity). The taxon which is found also in our flora has not been studied from this aspect yet. The used methodology is of a bioassay-guided separation character. The Tubifex tubifex test (TT test) served as the basic biological test. From the methanol extract of the aerial part, ent-kaurane diterpene atractyloside was isolated, from the acetone extract of the aerial part, xanthumin and deacetyl-xanthumin, two derivatives of xanthanolides – sesquiterpene lactones, were isolated, and from the ethanol extract, phytosterols – β -sitosterol and stigmasterol. From the acetone extract of fruits, fatty acids were obtained.

Key words: *Xanthium spinosum* L. – Asteraceae – bioassay-guided separation – atractyloside – xanthanolides – Tubifex tubifex test

Čes. slov. Farm., 2005; 54, 141–144

Má

Úvod

Xanthium spinosum L. (řepeň trnitá), Asteraceae je jednoletá (10–80 cm vysoká) bylina. Lodyha je přímá, rozvětvená, na bázi listového řapíku s 1–2 bledě žlutými trojitými trny. Úbory jsou jednopohlavné a jednodomé. Nažka (značně tuhá, za zralosti hnědá) je hustě kryta háčkovitými osténky a uvnitř obsahuje dvě hladká černohnědá semena. Kvete v červenci až říjnu. Patří k ruderalnímu porostu. Tento druh původem z Jižní Ameriky je součástí naší flóry^{1, 2)}. Z hlediska farmakobotanického nebyl u nás studován. Literární rešerše jej popisuje jako rostlinný druh s možnými významnými biologickými aktivita-

mi jeho metabolitů³⁾. Intenzivnější zkoumání této rostliny začalo počátkem 70. let minulého století (především v USA)⁴⁾, kdy její metabolity (atraktylosid a karboxyatraktylosid) byly považovány za nadějnou perorální antidiabetika s mechanismem inhibice mitochondriální respirace. Látka přispívá k fixaci ADP na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány⁵⁾. Navazující hypoglykémie je výsledným efektem akcelerace glukózového uptake periferními tkáněmi a snížením jaterní glukoneogeneze. Zásah do mitochondriálního systému je však také příčinou relativně vysoké toxicity této rostliny i velmi nevýhodného terapeutického indexu⁶⁾, proto se rostlina v 80. letech minulého století rázem ocitla v kategorii

jedovatých rostlin. Je publikována řada zpráv o případech intoxikace skotu ^{7, 8)} způsobených přítomností kauranů ^{9, 10)} v rostlině, zejména v USA a Austrálii, kde je zaznamenán její hojný výskyt. Z jejích dalších metabolitů je nezbytné uvést xanthanolidy ^{11, 12)} (xanthumin, xanthinin, xanthatin), jejichž biologická aktivita není tolik známá. Nalezeny byly fytoosteroly ^{11, 13, 14)} (β -sitosterol, stigmasterol, kampessterol), mastné kyseliny ¹⁵⁾, sacharidy ¹⁶⁾, aminokyseliny ¹⁷⁾, siličné složky ¹⁵⁾. V tradiční východní medicíně se používá řadu let extrakt z této rostliny jako diuretikum, protiprůjmový a protinádorový prostředek ¹¹⁾. Cílem práce bylo provést fytochemickou studii taxonu *Xanthium spinosum* L. pěstovaného v našich podmínkách. Současně byla studie zaměřena na hodnocení biologické aktivity.

POKUSNÁ ČÁST

Materiál, přístroje, fytochemické metody

Sběr rostlinného materiálu byl proveden v letech 1998–2001 v Botanické zahradě léčivých rostlin FaF UK v Hradci Králové z účelové výsadby.

Nadzemní část rostliny byla sklizena v plné zralosti plodů v září 1998–2001.

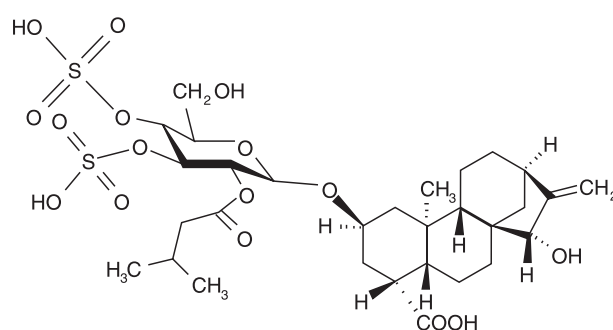
Zralé plody byly sklizeny v září 1999, nezralé plody v srpnu 2000 a klíčící rostliny (mající 2 pravé lístky) v červnu 2000.

Při sloupcové chromatografii byl použit Silikagel 100/250 (Lachema, Brno), při tenkovrstvé Silufol UV 254/366 (Kavalier, Sázava). Detekce chromatogramu byla provedena UV lampou Camag 254/366 nm. Teploty tání (t_f) byly stanoveny na mikrovýhřevném stolku Boetius a nejsou korigované. Záznamy spekter nukleární magnetické rezonance (NMR) byly prováděny na přístroji VARIAN Mercury – Vx BB 300 (^1H NMR 300 MHz; ^{13}C NMR 75,46 MHz). Chemické posuny jsou nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu jako referenční látce pomocí signálu zbytkového CHCl_3 a jsou udány v jednotkách ppm, interakční konstanty J jsou udány v jednotkách Hz. Hmotnostní spektra byla měřena na iontové pasti Esquire 300 (Bruker Daltonics, Německo) s možností analýzy MS/MS a MS^n s použitím ionizace elektrospřejem (ESI). Záznamy spekter GC-MS byly pořízeny na přístroji Turbo Mass kvadrupolový hmotnostní spektrofotometr s elektronovou ionizací Perkin Elmer Norwalk USA. Elementární analýza látky byla provedena na analyzátoru EA 1110 CHNS-O CE INSTRUMENTS.

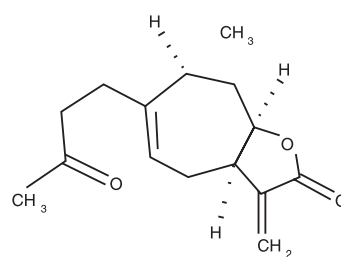
Izolace a identifikace

Kaureny

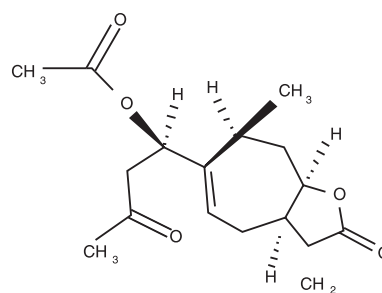
Extrakce natě *Xanthium spinosum* L. (1080 g) v Soxhletově extraktoru byla postupně provedena benzínem, CHCl_3 , CHCl_3 :MeOH (9:1), MeOH. Methanolvý extrakt (10,69 g), vykazující pozitivní reakci TT testu, byl dále dělen na sloupci silikagelu s 10 % vody v soustavě CHCl_3 :MeOH s nárůstem polární složky a postupným spojením, za provádění orientační TLC se standardem atraktylosidu (ATR), bylo získáno 40 frakcí, které byly spojeny do 5 frakcí, z čehož frakce 16–21 (krystaly žlutohnědé barvy, částečně rozpustné v MeOH a ve vodě, $R_F = 0,456$, t_f 173–187 °C, hmotnost 0,0527 g) vykazovala skvrnu, která je blízká hodnotě stan-



Obr. 1. Atraktylosid (ATR)



Obr. 2. Xanthumin (K1)



Obr. 3. Deacetylxanthumin (K2)

dardu atraktylosidu ($R_F = 0,466$, soustava n-butanol:kyselina octová:diethylether: H_2O (9:6:3:1), detekce vanilin:kyselina chloristá (1:1)). Vzhledem k malé hmotnosti spojené frakcí 16–21 bylo k potvrzení přítomnosti ATR použito HPLC – MS/MS. ATR (obr. 1) byl v této frakci prokázán porovnáním se standardem.

Obsah atraktylosidu je také často uváděn v plodech. Tato studie zahrnovala skrínink této látky v suchých plodech i v nezralých plodech, avšak nebyl prokázán ani ve stopovém množství. Ani fytochemická analýza klíčících rostlin nepotvrdila výskyt ATR.

Seskviterpenické laktony

Extrakcí natě (1180 g) v Soxhletově extraktoru acetonem bylo získáno 66 g extraktu, který byl dělen na sloupci silikagelu s 10 % vody eluotropní řadou CHCl_3 :MeOH stupňovitou elucí a bylo získáno celkem 10 frakcí, z níž frakce 4 byla rechromatografována na preparativní TLC v soustavě toluen:EtOAc (7:3) a poskytla krystalickou látku K1 (obr. 2). Látka byla podrobena strukturální analýze (t_f , ^1H NMR, ^{13}C NMR) a identifikována jako xanthanolidový lakton xanthumin – 2-acetyl-4-oxo-2,4-dihydroxy-1,11-xanthadien-12,8-olid (122,2 mg). Látka K2 (obr. 3) podobné chemické struktury byla izolována z frakce 6–7 po přečištění preparativní TLC

v acetonu. Stejnými identifikačními postupy bylo zjištěno, že se jedná o deacetylovaný xanthumin.

Struktura vzorků K1 a K2 byla určena pomocí rutinních 1D (¹H, ¹³C, DEPT) a 2D (COSY, HSQC, HMBC) NMR experimentů.

Xanthumin: krystaly bílé (téměř transparentní), velmi dobře rozpustné ve směsi CHCl₃:MeOH (1:1), rozpustné v MeOH, R_F = 0,62, t_R 94–100 °C, hmotnost 0,1222 g, ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6,16 (1H, d, J = 3,5, =CH₂); 5,97 (1H, dd, J₁ = 9,4, J₂ = 3,5, =CH-); 5,58 (1H, dd, J₁ = 8,1, J₂ = 5,6, -CH(OAc)-); 5,44 (1H, d, J = 2,9, =CH₂); 4,35–4,20 (1H, m, -(CH)O-); 2,91 (1H, dd, J₁ = 16,0, J₂ = 8,1, CH₂CO); 2,85–2,70 (1H, m); 2,60 (1H, dd overlapped, J₁ = 16,0, J₂ = 5,6, CH₂CO); 2,54 (1H, ddd overlapped, J₁ = 16,0, J₂ = 9,4, J₃ = 2,4); 2,50–2,25 (2H, m); 2,17 (3H, s, CH₃CO); 2,15–2,05 (1H, m); 2,03 (3H, s, CH₃COO-); 1,72 (1H, td, J₁ = 12,3, J₂ = 3,5); 1,11 (3H, d, J = 7,3, -CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 204,15; 169,62; 169,56; 144,53; 139,03; 127,05; 118,62; 81,95; 76,02; 47,96; 47,24; 36,87; 30,56; 29,84; 25,36; 21,21; 19,39.

Deacetylxanthumin: krystaly bílé (téměř transparentní), velmi dobře rozpustné v CHCl₃:MeOH (1:1), rozpustné v MeOH, R_F = 0,64, t_R 121–122 °C, hmotnost 0,002 g, ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7,07 (1H, d, J = 16,1, -CH=); 6,29 (1H, bdd, J₁ = 9,3, J₂ = 3,3, -CH=); 6,21 (1H, d, J = 3,5, =CH₂); 6,20 (1H, d, J = 16,1, -CH=); 5,49 (1H, d, J = 3,3, =CH₂); 4,35–4,25 (1H, m, -(CH)O-); 3,15–3,00 (1H, m); 2,80 (1H, ddd, J₁ = 16,7, J₂ = 9,1, J₃ = 2,5); 2,65–2,50 (1H, m); 2,31 (3H, s, CH₃CO); 1,85 (1H, td, J₁ = 12,6, J₂ = 3,8); 1,11 (3H, d, J = 7,6, -CH₃), ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 198,5; 169,7; 148,5; 144,7; 139,14; 138,1; 124,7; 119,0; 81,5; 47,4; 36,6; 29,1; 27,9; 27,2; 18,8.

V sumárním acetonovém extraktu natě byl identifikován na základě provedené elementární analýzy anorganické složky KNO₃.

Fytosteroly

Část natě (1870 g) byla perkolována podle ČsL4¹⁶ ethanolem, perkolát byl zahuštěn na 136 g a 2x dělen na sloupci silikagelu s 10 % vody eluovaným CHCl₃. Výsledkem byla směs fytosteroidů označená jako K3, která byla identifikována pomocí GC-MS a porovnáním s údaji v databázi jako dvou-složková směs β-sitosterolu a stigmasterolu. Směs β-sitosterolu a stigmasterolu: krystaly bílé s částečně voskovitým vzhledem, rozpustné v CH₂Cl₂, nerozpustné v MeOH, R_F = 0,311, t_R 145–152 °C, hmotnost 0,0316 g.

Mastné kyseliny

Byly stanoveny při pátrání po kauranech v suchých plodech. O jejich výskytu zde jsou publikovány^{28, 31} údaje. Odloučení semen od oplodí i rozdrobnění obojího se ukázalo technicky náročné. Rychlořeznými noži se pouze podařilo rozdělit poněkud jemnější perikarp. Ten byl pak extrahován v Soxhletově aparatuře acetonem. Acetonový extrakt byl dělen na silikagelové koloně s 12,5 % vody eluční řadou CHCl₃, CHCl₃: MeOH (98:2, 96:4, 92:8, 70:30) a bylo získáno 21 frakcí, které byly pospojovány do 14 frakcí. Z toho frakce 5 po přečištění na malé koloně silikagelu s 12,5 % vody s mobilní fází CHCl₃:xylene (80:20), CHCl₃, CHCl₃:MeOH (80:20) poskytla 7 frakcí, z níž nejčistší frakce 2 byla poskytnuta na GC-MS analýzu. Vzorek obsahoval především mastné kyseliny s dominantním zastoupením kyseliny palmitové, palmitolejové, nonandiové, stearové, olejové a arachidonové.

Sacharidy

V methanolovém extraktu natě byla chromatograficky (TLC) potvrzena sacharóza, glukóza, fruktóza na základě porovnání se standardy (n-butanol:kyselina octová:diethyl-ether:H₂O (9:6:3:1), detekce anilínovým činidlem na cukry).

Aminokyseliny

V methanolovém extraktu natě byly chromatograficky (TLC) potvrzeny prolin, serin, alanin, valin, leucin, kyselina

asparagová, fenylalanin (jejich standardy jsme měli k dispozici), CHCl₃:MeOH (85:15), detekce směsí vanilin:k. chloristá (1:1) s následným zahřátím na 105 °C.

Hodnocení biologické aktivity

Tubifex tubifex test, který ve své základní formě byl publikován Tichým¹⁷, byl upraven tak, aby byl použitelný pro sledování extrakčního osudu biologicky aktivních složek pro potřeby „bioassay-guided separace“ a jako takový je použitelný i jako orientační test akutní toxicity směsí metabolitů (izolačních meziproductů) a definovaných izolátů. Test je proveditelný v časovém rozmezí 60 minut včetně přípravy a vyhodnocení, je finančně nenáročný a splňuje pravidla ekologické šetrnosti. Frakce 16–21 obsahující předpokládanou účinnou látku nevykazovala pozitivní TT test.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Fytochemickou analýzou byly v rostlině identifikovány pouze stopy atraktylosidu a dále pak izolovatelná množství xanthuminu, deacetylxanthuminu, β-sitosterolu a stigmasterolu. Kauranový diterpen – atraktylosid byl ve frakci potvrzen na základě srovnání se standardem pomocí metody HPLC – MS/MS. Fytosteroly – β-sitosterol a stigmasterol byly prokázány na základě srovnání spekter se standardy získaných metodou GC-MS. Struktury seskviterpenických laktonů – xanthuminu a deacetylxanthuminu byly objasněny na základě 1D (¹H, ¹³C, DEPT) a 2D (COSY, HSQC, HMBC) NMR spekter.

Dělení obsahových látek provázené testem biologické aktivity („bioassay-guided separací“) urychlující dosažení výsledku je již dnes běžnou praxí, využití TT testu je však originální a vedlo k bezprostřednímu posouzení významného fenoménu spojovaného s tímto taxonem – akutní toxicity. Je pravděpodobné, že hmotnostní zastoupení ATR bylo tak nízké, že nebylo možné dosáhnout účinné koncentrace. Toxicita methanolového extraktu (se stanovenou EC₅₀), ze kterého byla frakce 16–21 oddělena, spočívá pak nejen v samotném obsahu ATR, ale také v přítomnosti dalších látek. Tento závěr podporují i výsledky ekotoxikologického testování (využívající dafnie a zelené řasy v provedení podle oficiálních doporučení pro ekotoxikologické laboratoře^{18, 19}), které vykazovalo vyšší toxicitu methanolového extraktu než ATR a sloužilo zároveň pro potvrzení výsledků TT testu. Zjištěná hodnota řadí methanolový extrakt do kategorie látek středně jedovatých (třída toxicity 3).

Významný obsah toxických látek v *Xanthium spinosum* L. rostoucím na našem území nebyl potvrzen na rozdíl od údajů publikovaných v zahraničních pracích²⁰. Alternativní testy toxicity řadí rostlinu mezi středně toxickou.

Práce je finančně podporována granty MŠMT – Výzkumné centrum LN00B125 a Výzkumný záměr 111600003.

LITERATURA

1. **Dostál, J.:** Nová květena ČSSR 2. Praha, Academia, 1989, s. 1018.
2. **Takhtajan, A.:** Diversity and classification of flowering plants. New York, Columbia University Press, 1997, s. 419.
3. **Ansari, A. H., Dubey, K. S.:** Asian J. Chem., 2000; 12, 521.
4. **Turner, C. E., Craig, J. C., Jr.:** United States Patent 3,950,518, Apr. 13, 1976.
5. **Voet, D., Voetová, J. G.:** Biochemie. Praha, Victoria Publishing, 1990, s. 559.
6. **Ghisalberti, E. L.:** Fitoterapia, 1997; 68, 318.
7. **Guin, J. D., Skidmore, G.:** Arch. Dermatol., 1987; 123, 500.
8. **Parsons, W.T.:** Noxious weeds of Victoria. Melbourn, Australia, Inkata Press, Ltd, 1973, s. 300.
9. **Cole, R. J., Stuart, B. P., Lansden, J. A., Cox, R. H.:** J. Agric. Food Chem., 1980; 28, 1330.
10. **Stuart, B. P., Cole, R. J., Gosser, H. S.:** Vet. Pathol., 1981; 18, 368.
11. **Metwally, A. M., Khafagy, S. M., El-Naggar, S. F.:** Pharmazie, 1974; 29, 415.
12. **Malik, M. S., Sangwan, N. K., Dhindsa, K. S.:** Phytochemistry, 1993; 32, 206.
13. **Bisht, N. P. S., Singht, R.:** J. Indian. Chem. Soc., 1977; 55, 707.
14. **Abdei-Mogib, M., Dawidar, A. M., Metwally, A. M.:** Phytochemistry, 1991; 30, 3461.
15. **Baslas, R. K.:** Herba Hung., 1981; 20, 223.
16. **Kolektiv autorů:** Československý lékopis, 4. vyd., sv. 2. Praha, Avicenum, 1987, s. 51.
17. **Tichý, M., Trčka, V., Roth, Z.:** Environ. Health Persp., 1985; 61, 321.
18. Sbírký zákonů č. 299/1998 Sb., s. 8557.
19. Sbírký zákonů č. 258/2001 Sb., s. 6276.
20. **Bruneton, J.:** Toxic Plants Dangerous to Humans and Animals. Andover, Intercept Ltd., 1999, s. 175.

Došlo 27. 4. 2004.

Přijato ke zveřejnění 11. 5. 2004.

PharmDr. Jana Klečáková-Karličková, Ph.D.
 Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
 e-mail: jana.karlickova@faf.cuni.cz

České a slovenské odborné časopisy s impakt faktorem

Titul -----	IF 2003		
Acta Vet. Brno-----	-0,336	Folia Geobot.-	----- 1,057
Acta Virol. -----	-0,683	Folia Microbiol. -----	0,857
Ceram-Silikaty -----	-0,449	Folia Parasit. -----	0,469
Cesk. Psychol. -----	-0,232	Folia Zool. -----	0,494
Cesk. Slov. Neurol. N. -----	-0,047	Chem. Listy -----	0,345
Collect. Czech Chem. C -----	-1,041	Kybernetika-----	0,319
Czech J. Anim. Sci.-----	-0,217	Listy Cukrov.-----	0,085
Czech J. Phys. -----	-0,263	Photosynthetica -----	0,661
Czech Math. J. -----	-0,210	Physiol. Res -----	0,939
Eur. J. Entomol. -----	-0,741	Polit. Ekon. -----	0,235
Financ. a Uver-----	-0,112	Rost. vyroba -----	0,276
Folia Biol. Prague-----	-0,527	Sociol. Cas.-----	0,063
		Stud. Geophys. Geod. -----	0,426
		Vet. Med. Czech-----	0,608

Zdroj: Journal Citation Reports 2003, ISI, Philadelphia USA
 Převzato z AV ČR, leden 2005