

Obsahové látky *Philadelphus coronarius* L.

GRANČAI D.¹, VALKO V.¹, ŠVAJDLENKA, E.²

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra farmakognózie a botaniky

²Veterinárni a farmaceutická univerzita v Brne, Farmaceutická fakulta, Ústav prírodných liečiv

Došlo 19. srpna 2010 / Prijato 10. září 2010

SÚHRN

Obsahové látky *Philadelphus coronarius* L.

Predložená práca sa zaoberá izoláciou a identifikáciou obsahových látok prítomných v listoch pajazmínu vencového – pustomyru věncového (*Philadelphus coronarius* L.). Metanolový extrakt sme roztrepávali do etylacetátu a vody. Z etylacetátového podielu sme izolovali dva flavonoidy: kempferol-3-O-rutinozid a kvercetin-3-O-rutinozid (rutín). Uvedené látky sme identifikovali pomocou spektrálnych metód, porovnaním výsledkov so štandardami a literatúrou.

Kľúčové slová: *Philadelphus coronarius* – kempferol-3-O-rutinozid – kvercetin-3-O-rutinozid

Čes. slov. Farm., 2010; 59, 219–221

SUMMARY

Constituents of *Philadelphus coronarius* L.

The paper deals with the isolation and identification of secondary metabolites from Mock Orange leaves (*Philadelphus coronarius* L.). A methanolic extract was partitioned between ethyl acetate and water. Two flavonoids, kaempferol-3-O-rutinoside and quercetin-3-O-rutinoside (rutin), were isolated from the ethyl acetate fraction. The substances were identified by spectral methods, comparing results with the standards and literature.

Key words: *Philadelphus coronarius* – kaempferol-3-O-rutinoside – quercetin-3-O-rutinoside

Čes. slov. Farm., 2010; 59, 219–221

Má

Úvod

Philadelphus coronarius L. – pajazmín vencový z čeľade Hydrangeaceae je 2–3 m vysoký ker, ktorý sa u nás pestuje v parkoch a v záhradách ako oblúbená okrasná rastlina hlavne pre svoje intenzívne a príjemne voňajúce biele kvety. Obsahovým látkam tohto druhu a ich biologickým účinkom bolo doteraz venovaných už niekoľko prác. Po zistení cytotoxikkej a antimikrobiálnej aktivity etanolového extraktu^{1, 2)} sme začali študovať sekundárne metabolity, ktoré by sa mohli na danej aktivite podieľať. V rode *Philadelphus* L. boli doteraz opísané hlavne látky polyfenolického charakteru ako flavonoidy a aromatické kyseliny³⁾, ktorých obsah v nadzemných častiach rastliny bol stanovený kolorimetricky⁴⁾. Z konárov tejto rastliny boli izolované triterpény taraxerol, amyriín, kyselina ursolová a oleanolová, ďalej kyselina kávová a protokatechová⁵⁾, z listov kumaríny umbeliferón a skopoletín, ďalej stigmasteryl-3 β -D-glukozid, triterpény uvaol a 3 β , 28 β -dihydroxyoleán – 11(12), 13(18) – dién⁶⁾, flavonoidové glykozidy apigenín-7-O-glukozid (kozmozid) a luteolín-7-O-glukozid (cynarozid)⁷⁾.

Predložená práca opisuje izoláciu a identifikáciu obsahových látok z listov *Philadelphus coronarius* L. a prináša nové poznatky o výskyte flavonoidov v tejto časti rastliny.

Adresa pro korespondenci:

prof. RNDr. Daniel Grančai, CSc.
Katedra farmakognózie a botaniky FaF UK
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, Slovenská republika
e-mail: grancai@fpharm.uniba.sk

POKUSNÁ ČASŤ

Materiál a metódy

Listy *Philadelphus coronarius* L. boli nazbierané v Arboréte Mlyňany v Ústave dendrobiológie Slovenskej akadémie vied a usušené pri laboratórnej teplote.

Na separáciu obsahových látok sme použili silikagél zn. Silpearl, pripravený podľa Pitru a Štěrbu⁸⁾ a Sephadex LH-20 (Pharmacia, Uppsala, Švédsko). Na tenkovrstvovú chromatografiu bol použitý Silufol UV 254 a 366 nm (Kavalier, Votice). Detekcia chromatogramov sa robila ultrafialovým žiarením pri 254 a 366 nm po predchádzajúcom postriekaní chromatogramu Naturs-toffreagenz A v metanole. Rozpúšťadlá použité pri chromatografii boli pred použitím predestilované.

Pri navažovaní sme používali analytické váhy Chyo JL-200 (Chyo, Japonsko). Teploty topenia sme merali na Koflerovom bloku (VEB Analytik Dresden, Nemecko) a nie sú korigované. Ultrafialové spektrá boli merané na prístroji Specord UV-VIS (Carl Zeiss, Jena, Nemecko) v metanole a po pridaní špecifických diagnostických skúmadiel podľa Mabryho⁹⁾, infračervené spektrá na prístroji FT-IR Impact 400 D (Nicolet, Anglicko), hmotnostné spektra na prístroji HPLC Agilent 1100 Series s MS ion trap detektorom.

Extrakcia a izolácia látok

Zo 700 g usušených a pomletých listov *Philadelphus coronarius* L. sa v Soxhletových aparátúrach pripravili 4 extrakty: petroléterový, chloroformový, metanolový a butanolový. Metanolový extrakt sa vytrepal do etylacetátu a vody. Látky prítomné v etylacetátovom extrakte (15 g) sa delili na stĺpci silikagélu elúciou zmesou rozpúšťadiel chloroform : metanol : benzén v rôznom pomernom zastúpení. Eluáty sa zachytávali v množstvách približne po 100 ml. Tieto sa postupne odparovali a na základe výsledkov tenkovrstvovej chromatografie spojili do 17 frakcií hrubého delenia.

Rechromatografiou frakcie č. 15 a č. 16 sa získali dve mikrokryštalické látky.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Etanolový extrakt z listov *Philadelphus coronarius* L. sme delili roztrepávaním medzi vzájomne sa nemiešajúce rozpúšťadlá. Delenie etylacetátového podielu sme robili na kolóne silikagélu č. 3 v sústave chloroform : metanol : benzén.

Rechromatografiou frakcie č. 15 na Sephadex LH-20 a po kryštalizácii z metanolu sme získali 7,3 mg svetložltých kryštálov s teplotou topenia 180–184 °C (I). Hmotnostné spektrum látky poskytlo v negatívnom móde molekulový ión [M-H⁺] o m/z 593 (glykozid)

a fragment o m/z 285 (aglykón). V IČ spektre sú pásy hydroxylových skupín pri 1035 a 3370 cm⁻¹, pás pri 2915 cm⁻¹ typický pre metylénové skupiny, pás konjugovaného karbonylu pri 1650 cm⁻¹, pás pri 1070 cm⁻¹ typický pre vibrácie C-O sacharidovej zložky a pás pri 830 cm⁻¹ patriaci 1,2,3,5-tetrasubstituovanému benzénu. Ultrafialové spektrum v metanole vykazuje pásy typické pre flavón: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 268 a 350.

Po pridaní špecifických diagnostických skúmadiel sme namerali nasledujúce posuny maxim:

$\lambda_{\text{NaOMe}}^{\text{max}}$	nm: 277, 325, 405	$\Delta I = + 55$ nm
$\lambda_{\text{AlCl}_3}^{\text{max}}$	nm: 277, 305, 354, 408	$\Delta I = + 58$ nm
$\lambda_{\text{AlCl}_3/\text{HCl}}^{\text{max}}$	nm: 277, 305, 354, 408	$\Delta I = + 58$ nm
$\lambda_{\text{NaOAc}}^{\text{max}}$	nm: 277, 307, 386	$\Delta II = + 7$ nm
$\lambda_{\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3}^{\text{max}}$	nm: 270, 310, 366	$\Delta I = + 16$ nm

Na základe výsledkov spektrálnej analýzy a tenkovrstvovej chromatografie na Silufole možno predpokladať, že látka (I) je glykozid kempferolu. To sme dokázali enzymatickou hydrolyzou (viď ďalší text).

Rechromatografiou frakcie č. 17 na Sephadex LH-20 a po kryštalizácii z metanolu sme získali 8,1 mg svetložltých kryštálov s teplotou topenia 183–187 °C (II). Hmotnostné spektrum látky poskytlo v negatívnom móde molekulový ión [M-H⁺] o m/z 609 (glykozid) a fragment o m/z 301 (aglykón). V IČ spektre sú pásy hydroxylových skupín pri 1035 a 3415 cm⁻¹, pásy metylénových a metylénových skupín pri 2920 a 2940 cm⁻¹, pás konjugovaného karbonylu pri 1660 cm⁻¹ a pás pri 1150 cm⁻¹ typický pre vibrácie C-O sacharidovej zložky.

Ultrafialové spektrum v metanole vykazuje pásy typické pre flavón: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 257, 265sh, 300sh a 349.

Po pridaní špecifických diagnostických skúmadiel sme namerali nasledujúce posuny maxim:

$\lambda_{\text{NaOMe}}^{\text{max}}$	nm: 270, 328, 412	$\Delta I = + 54$ nm
$\lambda_{\text{AlCl}_3}^{\text{max}}$	nm: 275, 305 sh, 433	$\Delta I = + 75$ nm
$\lambda_{\text{AlCl}_3/\text{HCl}}^{\text{max}}$	nm: 275, 305 sh, 433	$\Delta I = + 75$ nm
$\lambda_{\text{NaOAc}}^{\text{max}}$	nm: 273, 307 sh, 392	$\Delta II = + 16$ nm
$\lambda_{\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3}^{\text{max}}$	nm: 262, 286 sh, 379	$\Delta I = + 21$ nm

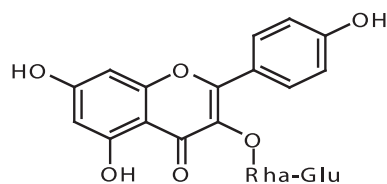
Na základe výsledkov spektrálnej analýzy a tenkovrstvovej chromatografie na Silufole možno predpokladať, že látka (II) je glykozid kvercetínu. To sme dokázali enzymatickou hydrolyzou.

Enzymatická hydrolyza látok I a II

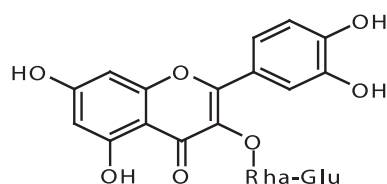
Enzymatickú hydrolyzu sme uskutočnili β -glykozidázou (Sigma-Aldrich). Látku (I) sme rozpustili v zmesi metanol : voda = 1 : 1 a po pridaní enzýmu nechali zmes inkubovať 15 hodín pri laboratórnej teplote. Po tomto čase sme roztok prefiltrovali a po odparení metanolu vytrepali s etylacetátom. Rovnakým spôsobom sme postupovali so vzorkou (II). Etylacetátové výtrečky látok (I a II) sme chromatograficky analyzovali spolu so štandardami kempferolom a kvercetínom na Silufole. Zistili sme, že látka (I) je po hydrolyze totožná s kempferolom a látka (II) je po hydrolyze zhodná s kvercetínom. Vo vodnom podieli hydrolyzátozov sme dokázali

chromatograficky na Lucefole prítomnosť glukózy a ramnózy.

Na základe porovnania UF spektier aglykónov s UF spektrami kempferolu a kvercetínu, porovnaním nameraných údajov s literatúrou^{9,10)} a so štandardami sme dokázali, že izolovaná látka (I) je kempferol-3-O-rutinozid a látka (II) je kvercetín-3-O-rutinozid (rutín).



kempferol-3-O-rutinozid



kvercetín-3-O-rutinozid (rutín)

Obr. 1. Vzorce: kempferol-3-O-rutinozid – kvercetín-3-O-rutinozid

Práca bola realizovaná s podporou grantovej úlohy č. 1/4289/07 VEGA MŠ SR.

LITERATÚRA

1. **Jantová, S., Nagy, M., Ružeková, L., Grančai, D.:** Cytotoxic Effects of Plant Extracts from the Families Fabaceae, Oleaceae, Philadelphaceae, Rosaceae and Staphyleaceae. *Phytother Res.*, 2001; 15, 22–25.
2. **Jantová, S., Nagy, M., Ružeková, L., Grančai, D.:** Antibacterial Activity of Plant Extracts from the Families Fabaceae, Oleaceae, Philadelphaceae, Rosaceae and Staphyleaceae. *Phytother Res.*, 2000; 14, 601–603.
3. **Billek, G., Kindl, H.:** Über die phenolischen Inhaltstoffe der Familie Saxifragaceae. *Monatsch Chem.*, 1962; 93, 85–98.
4. **Grančai, D., Mučaji, P., Nagy, M.:** Stanovenie vybraných sekundárnych metabolitov a extraktívnych látok vo *Philadelphus coronarius* L. *Čes. slov. Farm.*, 1999; 48, 265–267.
5. **Mučaji, P., Grančai, D., Nagy, M., Czigleová, S., Ubik, K.:** Obsahové látky konárov *Philadelphus coronarius* L. *Farm. Obzor*, 2001; 70, 311–314.
6. **Mučaji, P., Grančai, D., Nagy, M., Czigleová, S., Buděšínský, M., Ubik, K.:** Nepolárne obsahové látky listov *Philadelphus coronarius* L. *Čes. slov. Farm.*, 2001; 50, 274–276.
7. **Valko, V., Grančai, D.:** Flavonoidové glykozidy vo *Philadelphus coronarius* L. *Farm. Obzor*, 2005; 74, 150–152.
8. **Pitra, J., Štěrba, J.:** Třídění silikagélu pro chromatografii. *Chem. Listy.*, 1963; 57, 389–391.
9. **Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B.:** The systematic identification of flavonoids. Springer Verlag 1970, s. 354.
10. **Devon, T. K., Scott, A. I.:** Handbook of Naturally Occuring Compounds. New York, Inc.: Academic Press 1975, s. 644.