

PŮVODNÍ PRÁCE

Flavonoidy – hlavné obsahové látky listov *Philadelphus tenuifolius* Rupr. et Maxim.

Flavonoids – main constituents of the leaves of *Philadelphus tenuifolius* Rupr. et Maxim.

Daniel Grančai • Silvia Fialová • Viktor Huszár • Janka Karlovská • Emil Švajdlenka

Došlo 10. marca 2014 / Prijato 21. marca 2014

Súhrn

Predložená práca sa zaoberá izoláciou a identifikáciou flavonoidov prítomných v listoch pajazmínu tenkolistového (*Philadelphus tenuifolius* Rupr. et Maxim.). Z metanolového extraktu listov tejto rastliny bol izolovaný kvercetin-3-*O*-glukozid (izokvercitrín), z butanolového extraktu kempferol-3-*O*-glukozid-7-*O*-ramnozid. Izolované látky boli identifikované pomocou fyzikálno-chemických metód, porovnaním výsledkov so štandardami a literatúrou. Z rastlinného druhu *Philadelphus tenuifolius* Rupr. et Maxim. boli izolované prvýkrát.

Kľúčové slová: *Philadelphus tenuifolius* • *Hydrangeaceae* • flavonoidové glykozidy

Summary

The paper deals with the isolation and identification of the constituents of the leaves of *Philadelphus tenuifolius* Rupr. et Maxim. A methanolic extract was used to isolate quercetin-3-*O*-glucoside (isoquercitrin), and a butanolic extract to isolate kaempferol-3-*O*-glucoside-7-*O*-rhamnoside. Isolates were identified by physical-chemical data, comparison with authentic samples and literature data. The above-mentioned compounds were isolated from *Philadelphus tenuifolius* Rupr. et Maxim. for the first time.

Keywords: *Philadelphus tenuifolius* • *Hydrangeaceae* • flavonoid glycosides

Úvod

Philadelphus tenuifolius Rupr. et Maxim. – pajazmín tenkolistový z čeľade *Hydrangeaceae* je ker dosahujúci výšku 2–2,5 m. Rastie v zmiešaných lesoch, pochádza z východnej Sibíri, severnej Číny a Kórei. Obsahovým látkam tohto druhu a ich biologickým účinkom bolo doteraz venovaných málo prác. Zistenie cytotoxickej a antimikrobiálnej aktivity etanolového extraktu^{1–3)} nás viedlo k štúdiu sekundárnych metabolitov, ktoré sa môžu na nich podieľať. V rode *Philadelphus* L. boli doteraz opísané najmä látky polyfenolového charakteru ako flavonoidy a aromatické kyseliny⁴⁾, ktorých obsah v nadzemných častiach rastliny bol stanovený kolorimetricky⁵⁾. Z konárov príbuzného druhu *Philadelphus coronarius* L. boli izolované triterpény a kyseliny⁶⁾. Z listov to boli kumaríny, steroly, triterpény⁷⁾ a flavonoidové glykozidy^{8–10)}. Z listov *Philadelphus tenuifolius* Rupr. et Maxim. boli doteraz izolované látky nepolárneho charakteru – triterpény taraxerol, stigmasteryl-3-*O*-β-D-glukozid a kumaríny umbeliferón a eskulín¹¹⁾.

Predložená práca opisuje izoláciu a identifikáciu obsahových látok metanolového a butanolového extraktu z listov *Philadelphus tenuifolius* Rupr. et Maxim. a prináša nové poznatky o ich výskyte v tejto časti rastliny.

Pokusná časť

Materiál a metódy

Pri izolácii a identifikácii obsahových látok *Philadelphus tenuifolius* Rupr. et Maxim. sa použil metanolový a butanolový extrakt z listov. Listy sa nazbierali v Arborete Mlyňany, v Ústave dendrobiológie Slovenskej akadémie vied v septembri 2009 a usušili pri laboratórnej teplote.

Na separáciu obsahových látok sa použil silikagél zn. Silpearl, pripravený podľa Pitru a Štěrby¹²⁾ a Sephadex

prof. RNDr. Daniel Grančai, CSc. (✉) • S. Fialová • V. Huszár
Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta
Katedra farmakognózie a botaniky
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, SR
e-mail: grancai@fpharm.uniba.sk

J. Karlovská
Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta
Katedra fyzikálnej chémie liečiv, NMR laboratórium

E. Švajdlenka
Veterinárni a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta
Ústav prírodných liečiv

LH-20, na tenkovrstvovú chromatografiu Silufol UV 254 a 366 nm a Lucefol Quick (Kavalier, Votice, ČR) a silikagélové platne Kiesselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Detekcia chromatogramov sa robila UF žiarením pri 254 a 366 nm, kyselinou sírovou v éteri (1 : 4) s následným zahriatím na 120 °C, Neuovým skúmadlom a anilín-ftalátom¹³). Rozpúšťadlá použité pri chromatografii boli vopred predestilované.

Pri navažovaní sa používali analytické váhy Chyo JL-200 (Chyo, Japonsko). Teploty topenia sa merali na Kofflerovom bloku (VEB Analytik, Dresden) a nie sú korigované. Ultrafialové spektrá sa merali na prístroji Specord UV-VIS (Jena) v metanole a po pridaní špecifických diagnostických skúmadiel¹⁴). Hmotnostné spektrum na HPLC prístroji Agilent 1100 HP liquid chromatograph s MS ion trap detektorom. ¹H NMR a ¹³C NMR spektrá boli merané na Varian MERCURY plus NMR spektrometri (Varian, Palo Alto, CA, USA) pracujúcom pri frekvencii 300 MHz (¹H) a 75 MHz (¹³C). Kyslá hydrolyza sa robila 2% kyselinou sírovou; vodná fáza sa potom neutralizovala na DOWEX-e (FLUKA AG CHEMISCHE FABRIK BUCHS SG) podľa literatúry^{15, 16}).

Extrakcia a izolácia látok

Usušené a pomleté listy *Philadelphus tenuifolius* Rupr. et Maxim. (460 g) sme extrahovali v Soxhletovej aparátúre a po odparení rozpúšťadla vo vákuu sme získali petroléterový (27,3 g), chloroformový (14,1 g), metanolový (42,5 g) a butanolový (2,2 g) extrakt.

Metanolový extrakt sme delili kolónovou chromatografiu na silikagéli č. 3 s obsahom 13 % vody. Kolónu sme eluovali zmesou rozpúšťadiel chloroform : metanol : cyklohexán v rôznom pomernom zastúpení. Eluáty sme zachytávali v množstvách približne po 50 ml. Tieto sme postupne odparovali a na základe výsledkov tenkovrstvovej chromatografie spojili do 23 frakcií hrubého delenia.

Frakciu č. 8 sme rechromatografovali na stĺpci Sephadexu LH-20 v sústave izopropanol : metanol s nárastom polárnej zložky. Frakcie sme zachytávali po cca 10 ml a na základe výsledkov tenkovrstvovej chromatografie pospájali do 12 frakcií. Z frakcie č. 6 sme kryštalizáciou z metanolu získali látku I.

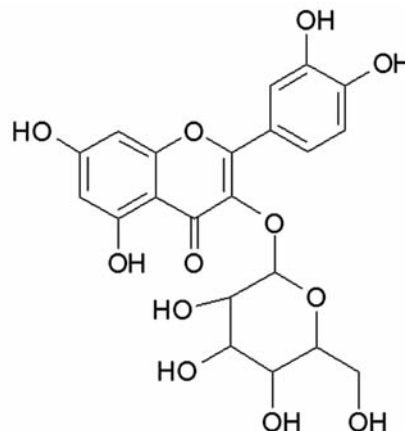
Rovnakým spôsobom sme delili látky prítomné v butanolovom extrakte. Kolónu sme eluovali zmesou rozpúšťadiel chloroform : metanol : cyklohexán v rôznom pomernom zastúpení. Eluáty sme zachytávali v množstvách približne po 50 ml. Na základe výsledkov tenkovrstvovej chromatografie sme získali 9 frakcií hrubého delenia.

Frakciu č. 6 sme rechromatografovali na silikagéli č. 4 v sústave chloroform : metanol (90 : 10, 85 : 15 a 80 : 20). Frakcie sme zachytávali po 5 ml a na základe výsledkov tenkovrstvovej chromatografie pospájali do 7 frakcií. Z frakcie č. 4 sme kryštalizáciou z metanolu získali látku II.

Výsledky a diskusia

Látka I (8,5 mg) (obr. 1) bola izolovaná vo forme svetložltých mikrokryštálov s teplotou topenia 182–184 °C. Hmotnostné spektrum vykazuje molekulový ión [M-H] o m/z 463 (glykozid kvercetínu, cukor 162) a fragment

o m/z 301 (aglykón). Ultrafialové spektrum v metanole vykazuje pásy typické pre flavón: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 254, 265sh, 293 a 358.



Obr. 1. Látka I

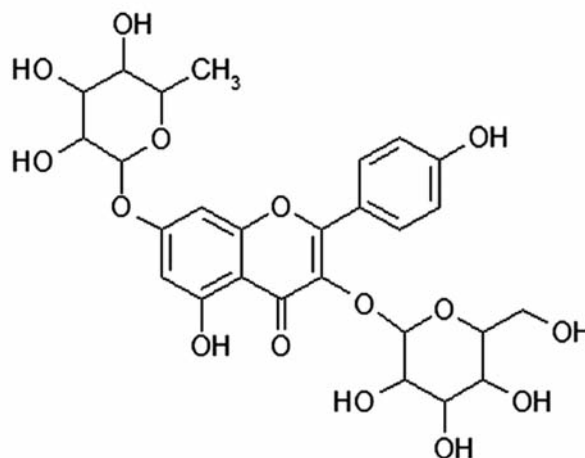
Po pridaní špecifických diagnostických skúmadiel sme namerali nasledujúce posuny maxim:

$\lambda_{\text{NaOMe}}^{\text{max}}$ nm:	270, 320 sh, 409
$\lambda_{\text{AlCl}_3}^{\text{max}}$ nm:	270, 295sh, 430
$\lambda_{\text{AlCl}_3/\text{HCl}}^{\text{max}}$ nm:	265, 295sh, 400
$\lambda_{\text{NaOAc}}^{\text{max}}$ nm:	267, 398
$\lambda_{\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3}^{\text{max}}$ nm:	256, 368

¹H NMR (300MHz, CD₃OD) d: 7.7 (1/2(2H), d, J = 2.06 Hz); 7.59 (1/2(2H), dd, J = 8.5 Hz; J = 2.06 Hz); 6.87 (1H, d, J = 5.50 Hz); 6.40 (1H, d, J = 2.05 Hz); 6.21 (1H, d, J = 2.05 Hz); 5.25 (1H, d, J = 7.62 Hz); 3.73–3.19 (6H, m)

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) d: 197.55; 166.11; 163.13; 159.03; 158.53; 149.90; 145.97; 135.63; 123.22 (2C); 117.56; 116.03; 105.72; 104.25; 99.92; 94.72; 78.45; 78.15; 75.76; 71.24; 62.57

Na základe výsledkov spektrálnej analýzy a tenkovrstvovej chromatografie na Silufole možno predpokladať, že látka (I) je glykozid kvercetínu. Aglykón získaný kyslou hydrolyzou bol zhodný so štandardom kvercetínu.



Obr. 2. Látka II

Cukorná zložka sa zhodovala so štandardom glukózy. Látku (I) sme identifikovali ako kvercetin-3-*O*-glukozid (izokvercitrín).

Látka II (11,5 mg) (obr. 2) bola izolovaná vo forme žltých mikrokryštálov s teplotou topenia 183–186 °C. Hmotnostné spektrum vykazuje molekulový ión [M-H] o *m/z* 593 (diglykozid kempferolu, cukry 162 a 146 v rôznych polohách) a fragment o *m/z* 448, 432 a 286. Ultrafialové spektrum v metanole vykazuje pásy typické pre flavón: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 268, 295sh a 355.

Po pridání špecifických diagnostických skúmadiel sme namerali nasledujúce posuny maxím:

$\lambda_{\text{max}}^{\text{NaOMe}}$ nm: 276, 323 sh, 407

$\lambda_{\text{max}}^{\text{AlCl}_3}$ nm: 274, 304sh, 407

$\lambda_{\text{max}}^{\text{AlCl}_3/\text{HCl}}$ nm: 274, 304sh, 399

$\lambda_{\text{max}}^{\text{NaOAc}}$ nm: 277, 395

$\lambda_{\text{max}}^{\text{NaOAc/H}_3\text{BO}_3}$ nm: 266, 362

^1H NMR (300MHz, DMSO) δ : 7.57 (2H, m); 6.87 (1H, d, *J* = 8.79 Hz); 6.46 (1H, d, *J* = 2.34 Hz); 6.23 (1H, d, *J* = 2.34 Hz); 5.44 (1H, m); 3.57 (2H, m); 3.36–3.11 (4H, m)

^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO) δ : 177.25; 163.77; 160.75; 156.24 (2C); 148.08; 144.47; 133.16; 121.57; 121.04; 115.93; 115.06; 103.84; 100.63; 98.49; 93.52; 77.18; 76.80; 73.80; 69.50; 60.58

Na základe výsledkov spektrálnej analýzy a tenkovrstvovej chromatografie na Silufole možno predpokladať, že látka (II) je glykozid kempferolu. Aglykón získaný kyslou hydrolýzou bol zhodný so štandardom kempferolu. Cukorné zložky sa zhodovali so štandardami glukózou a ramnózou. Látku (II) sme identifikovali ako kempferol-3-*O*-glukozid-7-*O*-ramnózid.

Práca bola realizovaná s podporou grantovej úlohy č. 1/0059/11 VEGA Ministerstva školstva SR. „Skríning biologických aktivít vybraných druhov liečivých rastlín a identifikácia ich aktívnych konštituentov“.

Stret záujmov: žiadny.

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. Vaľko V., Pravdová E., Nagy M., Grančai D., Ficková M. Cytotoxicity of plant extracts from genus *Philadelphus* L. *Chem. Listy* 2007; 101, 292–293.
4. Billek K., G., Kindl H. Über die phenolischen Inhaltstoffe der Familie Saxifragaceae. *Monatsch. Chem.* 1962; 93, 85–98.
5. Grančai D., Mučaji P., Nagy M. Stanovenie vybraných sekundárnych metabolitov a extraktívnych látok vo *Philadelphus coronarius* L. *Čes. slov. Farm.* 1999; 48, 265–267.
6. Mučaji P., Grančai D., Nagy M., Czigeleová S., Ubík K. Obsahové látky konárov *Philadelphus coronarius* L. *Farm. Obzor* 2001; 70, 311–314.
7. Mučaji P., Grančai D., Nagy M., Czigeleová S., Buděšínský M., Ubík K. Nepolárne obsahové látky listov *Philadelphus coronarius* L. *Čes. slov. Farm.* 2001; 50, 274–276.
8. Vaľko V., Grančai D. Flavonoidové glykozidy vo *Philadelphus coronarius* L. *Farm. Obzor* 2005; 74, 150–152.
9. Grančai D., Vaľko V., Švajdlenka E. Obsahové látky *Philadelphus coronarius* L. *Čes. slov. Farm.* 2010; 59, 219–221.
10. Grančai D., Fialová S., Karlovská J., Švajdlenka E. Sekundárne metabolity listov *Philadelphus coronarius* L. *Farm. Obzor* 2011; 80, 162–164.
11. Grančai D., Vaľko V., Švajdlenka E. Nepolárne obsahové látky v listoch *Philadelphus tenuifolius* Rupr. et Maxim. *Farm. Obzor* 2012; 81, 67–69.
12. Pitra J., Štěrba J. Třídění silikagélů pro chromatografii. *Chem. Listy* 1963; 57, 389–391.
13. Šaršúnová M., et al. Chromatografia na tenkých vrstvách vo farmácii a v klinickej biochémmi. Bratislava: Osveta 1977.
14. Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. R. The systematic identification of flavonoids, New York: Springer Verlag 1970.
15. Friedrich H. *Arch. Farm.* 1962; 295, 59.
16. Friedrich H. *Arch. Farm.* 1962; 295, 465.
17. Devon T. K., Scott A. I. Handbook of Naturally Occuring Compounds: Vol. I Acetogenins, Shikimates and Carbohydrates. New York: Academic Press 1975.