

NOVĚ IDENTIFIKOVANÉ FENOLICKÉ LÁTKY V PARAZITICKÝCH ROSTLINÁCH *Cuscuta europaea* A *Cuscuta campestris*

PETRA HŘIBOVÁ^{a*}, MILAN ŽEMLIČKA^a,
TOMÁŠ BARTL^b a EMIL ŠVAJDLENKA^a

^a Ústav přírodních léčiv, ^b Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno
cerfpatolog@seznam.cz

Došlo 3.7.08, přijato 19.9.08.

Klíčová slova: *Cuscuta europaea*, *Cuscuta campestris*, HPLC, fenolické látky

Úvod

Rostliny rodu *Cuscuta* (kokotice) jsou řazeny do čeledi Cucurbitaceae. Jde o jednoleté stonkovité parazitující byliny, většinou bez vlastního chlorofylu. Dospělý jedinec má nitkovité oranžové nebo žluté stonky, které se omotávají kolem hostitelských rostlin. Kontakt s hostitelem je zajištěn pomocí haustorií, která pronikají do pletiv hostitele a tak zajišťují výživu rostliny. Rostlina je zcela závislá na svém hostiteli, po vyklíčení semene ho musí nalézt do 5 až 10 dnů, jinak umírá¹.

Rod *Cuscuta* zahrnuje asi 150 druhů a je rozšířen celosvětově s výjimkou nejchladnějších oblastí². *C. chinensis* Lam. (kokotice čínská) je hojně využívána v čínském lidovém léčitelství při léčbě onemocnění jater a ledvin³, dále byly u methanolického extraktu ze semen této rostliny prokázány protirakovinové účinky⁴, u vodného extraktu imunostimulační a antioxidační účinky⁵.

Na území České republiky a Slovenska je hojně rozšířená *C. europaea* L. (kokotice evropská) a *C. campestris* Yuncker (kokotice ladní)¹. Z nejvýznamnějších obsažených látek byly dosud identifikovány fenolické kyseliny zahrnující chlorogenovou kyselinu, 3,5-dikafeoylchinovou kyselinu, 4,5-dikafeoylchinovou kyselinu, dále flavonoidy kempferol, kempferol-3-*O*-galaktosid, kempferol-3-*O*-glukosid, kvercetin, kvercetin-3-*O*-galaktosid a kvercetin-3-*O*-glukosid⁶. Identifikace dalších látek ze skupiny fenolických kyselin a flavonoidů metodami HPLC a MS byla předmětem této práce.

Experimentální část

Chemikálie

Standard isorhamnetin-3-*O*-glukosid byl zakoupen u firmy Roth (Karlsruhe, Německo), standardy isorhamnetin, kávová kyselina, *p*-kumarová kyselina a rozpouštědla methanol, voda a acetonitril pro HPLC u firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Rostlinný materiál

Sběr *C. europaea* parazitující na kopřivě (*Urticaceae*) byl proveden v červenci roku 2004 v České republice v blízkosti opevnění Stachelberg mezi městy Trutnov a Žaclěř, *C. campestris* parazitující na rdesnu (*Polygonaceae*) byla sbírána v červenci 2006 na Slovensku na jižním okraji města Vrábce. Identifikaci rostlinného materiálu provedl Ing. Peter Tóth, PhD. (Katedra ochrany rostlin Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre) a Ing. Milada Pízová (Ústav přírodních léčiv Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně).

Příprava vzorků

Rostlinný materiál (0,2 g) byl krátce po sběru lyofilizován, zmrazen kapalným dusíkem, rozdrčen na prášek a extrahován v 1 ml směsi methanol : voda (1:1). Extrakce byla podpořena ultrazvukem po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Po dekantaci a filtraci (filtr Millipore 0,45 μm) byly extrakty analyzovány pomocí HPLC metodou optimalizovanou pro analýzu polyfenolů.

Přístroje a použitá metoda

Měření byla provedena na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 (Agilent Technologies), s DAD a hmotnostním detektorem 1100 Series LC/MSD Trap VL. Byla použita kolona ABZ+PLUS (Supelco, USA), 150 mm × 4,6 mm, 3 μm.

Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu (MeCN) a 40 mM mravenčí kyseliny (HCOOH). Gradient od 0 min 10 % MeCN a 90 % HCOOH, do 36 min na 100 % MeCN, další 4 min následovalo promývání kolony 100% MeCN. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml min⁻¹, teplota kolony udržována na 30 °C. Použitá detekce DAD 254 nm. Hmotnostní spektra byla měřena v negativním módu. Zdroj iontů: ESI. Parametry iontové pasti: automatický MS2 mód, skenovací rychlost 13 000 m/z/s, tlak nebulizéru 483 kPa, průtok sušícího plynu 10 l min⁻¹, teplota sušení 350 °C, cílová hmota 300 m/z, řízené množství iontů v iontové pasti 30 000, maximální akumulací čas 300 ms, skenovací rozsah 50–1000 m/z.

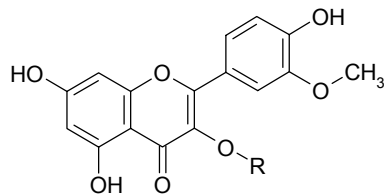
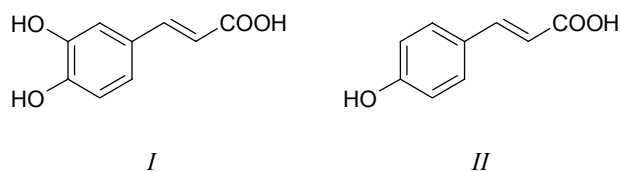
* Petra Hřibová získala za tuto práci zvláštní cenu poroty v soutěži O cenu firmy Merck 2008.

Výsledky a diskuse

Methanolické extrakty připravené z *C. europaea* a *C. campestris* byly podrobeny analýze HPLC, která v obou případech prokázala přítomnost celé řady fenolických látek. Sloučeniny byly identifikovány po separaci v analytické koloně srovnáním retenčních časů a UV-VIS spekter se standardy. Identifikace fenolů byla podpořena hmotnostní spektrometrií.

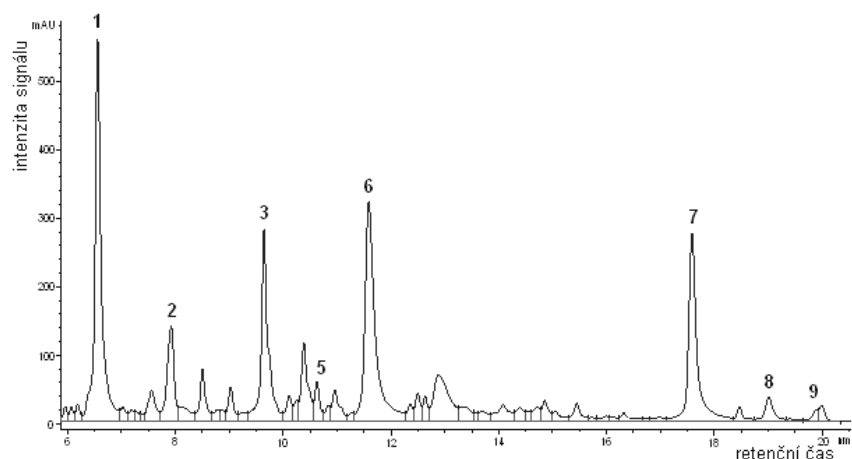
Na chromatografickém záznamu methanolického extraktu z *C. europaea* (obr. 1) se vyskytuje několik píků, z nichž dominantní odpovídá chlorogenové kyselině. Další významné píky odpovídají již dříve identifikovaným flavonoidům kempferolu, kvercetin, glukosidu a galaktosidu kvercetin. Intenzivní pik při 12 min je podle elektronového a hmotnostního spektra jedním z isomerů kyseliny dikafeoylchinové.

Nově byla v extraktu z *C. europaea* pomocí LC-MS v negativním módu nalezena kávová kyselina (I) s molekulovým iontem $[M-H]^-$ m/z 179, *p*-kumarová kyselina

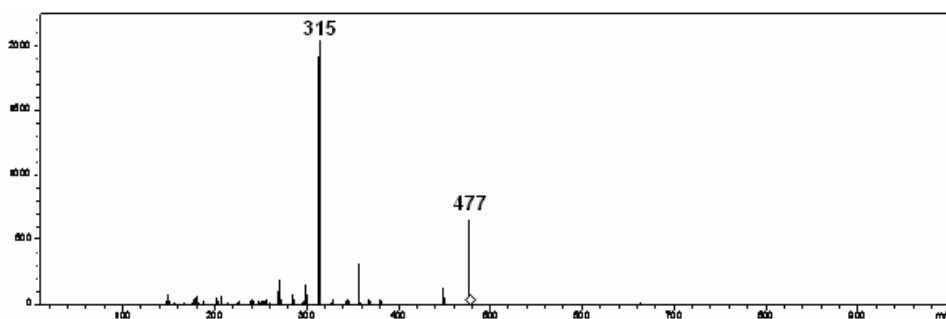


III R = H

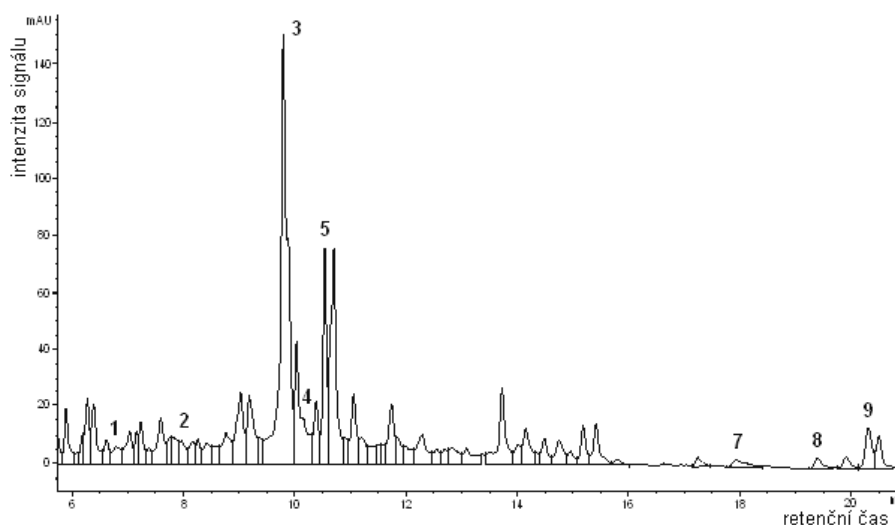
IV R = D-glukosyl



Obr. 1. Chromatogram extraktu *C. europaea*. (1) kyselina chlorogenová, (2) kyselina kávová, (3) směs kvercetin-3-*O*-galaktosidu a kvercetin-3-*O*-glukosidu, (5) isorhamnetin-3-*O*-glukosid, (6) blíže neurčená dikafeoylchinová kyselina, (7) kvercetin, (8) isorhamnetin, (9) kempferol. UV detekce při 254 nm



Obr. 2. Hmotnostní spektrum a fragmentace isorhamnetin-3-*O*-glukosidu (negativní mód). Aglykon isorhamnetin ($[M-H]^-$ m/z 315) vznikl odtržením glukosy (m/z 162) z molekulového iontu isorhamnetin-3-*O*-glukosidu ($[M-H]^-$ m/z 477)



Obr. 3. Chromatogram extraktu *C. campestris*. (1) chlorogenová kyselina, (2) kávová kyselina, (3) směs kvercetin-3-*O*-galaktosidu a kvercetin-3-*O*-glukosidu, (4) *p*-kumarová kyselina, (5) isorhamnetin-3-*O*-glukosid, (7) kvercetin, (8) isorhamnetin, (9) kempferol. UV detekce při 254 nm

lina (II) s molekulovým iontem $[M-H]^-$ m/z 163 a molekulový ion $[M-H]^-$ m/z 315, který odpovídal isorhamnetinu (III). Jednoznačně byla potvrzena přítomnost isorhamnetinu po jeho izolaci společným nástřikem se standardem. Molekula s $[M-H]^-$ m/z 477, jejíž fragmentací vznikly částice s m/z 162 odpovídající hexose a fragment $[M-H]^-$ m/z 315 odpovídající aglykonu isorhamnetinu, je zřejmě isorhamnetin-hexosid (obr. 2). Po porovnání se standardem byla sloučenina identifikována jako isorhamnetin-3-*O*-glukosid (IV).

V extraktu z *C. campestris* (obr. 3) byla rovněž nalezena kávová kyselina, *p*-kumarová kyselina, isorhamnetin a isorhamnetin-3-*O*-glukosid. Methanolický extrakt z *C. campestris* se od extraktu z *C. europaea* kvalitativně lišil hlavně v obsahu polárnějších látek, kdy extrakt z *C. campestris* obsahoval širší spektrum látek s aromatickým kruhem než extrakt z *C. europaea*.

Závěr

V methanolickém extraktu z rostlin rodu *Cuscuta* byla vedle několika již známých látek ze skupiny fenolických kyselin nově identifikována kávová kyselina, *p*-kumarová kyselina a ze skupiny flavonoidů isorhamnetin a isorhamnetin-3-*O*-glukosid. Je pravděpodobné, že právě tyto látky jsou zodpovědné za biologickou aktivitu extraktů z různých druhů *Cuscuta*.

Naše poděkování patří Ing. Petru Tóthovi, PhD. a Ing. Miladě Pízové za identifikaci rostlinného materiálu a PharmDr. Karlu Šmejkalovi, Ph.D. za pečlivé přečtení rukopisu.

LITERATURA

1. Cagaň L., Tóth P.: *Metodika ochrany proti parazitickým burinám z rodu kukučína v agroekosystémech Slovenska*. SPU Nitra, Nitra 2005.
2. Holm L., Pancho J. V., Herberger J. P., Plucknett D. L.: *A Geographical Atlas of World Weeds*. John Wiley & Sons, New York 1979.
3. Ye M., Yan Y. N., Guo D. A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 1469 (2005).
4. Umehara K., Nemoto K., Ohkubo T., Miyase T., Degawa M., Noguchi H.: *Planta Med.* 70, 299 (2004).
5. Bao X., Wang Z., Fang J., Li X.: *Planta Med.* 68, 237 (2002).
6. Löffler C., Czygan F. C., Proksch P.: *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 297 (1997).

P. Hřibová^a, M. Žemlička^a, T. Bartl^b, and E. Švajdlenka^a (^a *Department of Natural Drugs*, ^b *Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*): **Newly Identified Phenolic Compounds in Parasitic Plants *Cuscuta europaea* and *Cuscuta campestris***

Cuscuta europaea and *Cuscuta campestris* (Cuscutaceae) are annual parasitic plants which wrap around host plants and penetrate their tissues using haustoria. There are more than 150 species of *Cuscuta* worldwide; *C. europaea* and *C. campestris* are the most common species in the Czech Republic and Slovakia. In this study phenolics were identified in methanolic extracts of these species by HPLC and MS. Among others, caffeic acid, *p*-coumaric acid, isorhamnetin and isorhamnetin 3-*O*-glucoside were found in the extracts.