

Kručinka barvířská (*Genista tinctoria* L.) – obsahové látky a biologická aktivita

LENKA TŮMOVÁ¹, JIŘÍ TŮMA²

¹Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, Katedra farmakognozie

²Univerzita Hradec Králové, Přírodovědecká fakulta, Katedra biologie

Došlo 25. ledna 2011 / Přijato 28. března 2011

SOUHRN

Kručinka barvířská (*Genista tinctoria* L.) – obsahové látky a biologická aktivita

Cílem práce bylo uvést všechny důležité obsahové látky v rostlině *Genista tinctoria*, které vykazují různou biologickou aktivitu. Jsou zde také zmíněny metody chemického hodnocení těchto látek.

Klíčová slova: *Genista tinctoria* – isoflavonoidy – chinolizidinové alkaloidy – *in vitro*

Čes. slov. Farm. 2011; 60, 61–64

SUMMARY

Dyer's Greenweed (*Genista tinctoria* L.): constituents and biological activity

The paper aims to specify all important active principles in the herb *Genista tinctoria* which exert different biological activities. It also mentions the methods of chemical evaluation of these substances.

Key words: *Genista tinctoria* – isoflavonoids – quinolizidine alkaloids – *in vitro*

Čes. slov. Farm. 2011; 60, 61–64

Má

Úvod

Rostliny musíme stále ještě považovat za dosud málo prozkoumanou zásobárnu farmaceuticky důležitých látek. Řada rostlinných látek je pro člověka nenahraditelná jako farmaka. K důležitým obsahovým látkám některých rostlin se řadí isoflavonoidy, které byly prokázány v různých druzích rodu *Genista*. Rod *Genista* L. (*Fabaceae*) zahrnuje 87 druhů převážně se vyskytujících ve Středomoří a je charakterizován přítomností flavonů, glykoflavonů a zejména vysokou koncentrací isoflavonů. *Genista tinctoria* – kručinka barvířská (*Fabaceae*) je 20–60 (až 200) cm vysoký polokeř rozšířený téměř po celé Evropě i Asii. Je to typická rostlina světlých lesů (doubřav), sušších luk, mezí, pastvin, slunných strání od nížin do podhorského pásma^{1,2}. Celá rostlina je jedovatá. Kvetoucí nať se sbírá od května do srpna. Suší se ve stínu. Umělá teplota při sušení nesmí být vyšší než 35 °C. Droga je bez pachu a chutná nahořkle svíravě. V lidovém léčitelství se používá pro svůj značně močopudný účinek při chorobách ledvin a močových cest jako

diuretikum. Diuretický účinek způsobují hlavně flavony a silice. Též se podává při nedostatečné srdeční činnosti a při otocích. Zrychluje střevní peristaltiku^{1,2}. Aplikuje se formou nálevu.

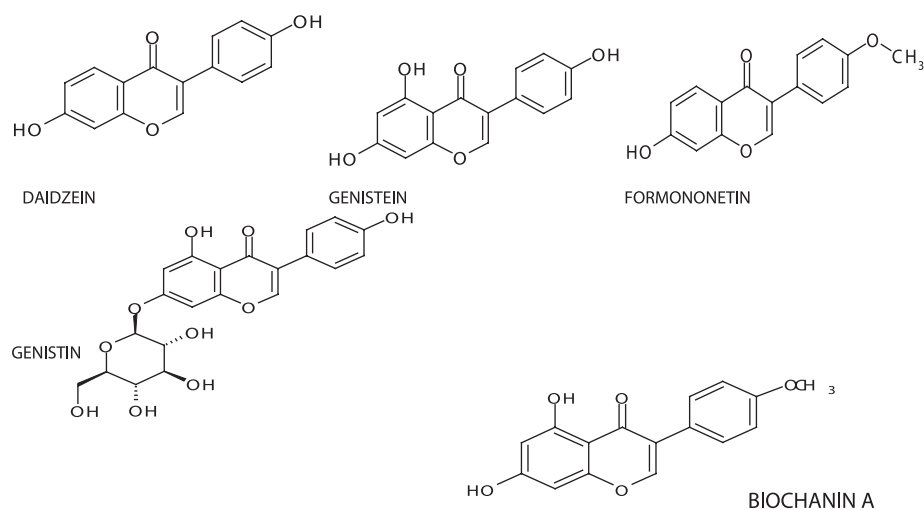
Isoflavonoidy a jejich biologická aktivita

Isoflavonoidy plní funkce v obranném systému rostliny jako přirozená ochrana proti infekci při klíčení semen, napadení hmyzem a poškozením škůdci¹. Biologické účinky isoflavonoidů jsou podmíněny vazbou fenylu na třetí uhlík. Byl prokázán antivirotický, antimykotický, protizánětlivý, analgetický účinek a také ulceroprotektivní účinek. Isoflavonoidy snižují krevní tlak a mohou navodit hypoglykémii. Některá literatura uvádí i spazmolytický účinek, ale studie zaměřená na farmakologický screening methanolových extraktů z rodu *Genista* tento účinek nepotvrdila. Další vlastností je antagonismus a agonismus na estrogenních receptorech^{6–13}.

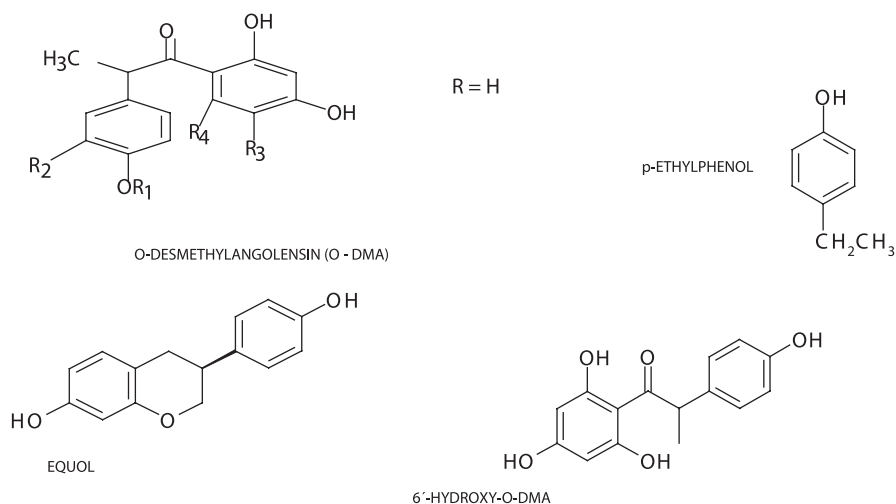
Isoflavonoidy patří k nejznámějším látkám s estrogenní aktivitou. Hrají důležitou roli v prevenci menopauzální

Adresa pro korespondenci:

doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.
Katedra farmakognozie FaF UK
Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové
e-mail: tumova@faf.cuni.cz



Obr. 1. Chemická struktura některých isoflavonů
BIOCHANIN A



Obr. 2. Struktura metabolitů isoflavonoidů
6'-hydroxy-O-DMA

ních příznaků, osteoporózy, aterosklerózy, kardiovaskulárních onemocnění a inhibují rozvoj a růst buněk nádorů prsu, vaječníků, prostaty a štítné žlázy⁶⁻¹⁴). Role fytoestrogenů v prevenci rakoviny je stále dále zkoumána a diskutována. Pro získávání isoflavonoidů je dnes nejvíce využívána čeleď *Fabaceae*, například sója (*Glycine max*) nebo jetel (*Trifolium pratense*). Dalšími, především potravinovými zdroji jsou semena a ořechy bohaté na oleje-slunečnicová semena (*Helianthus spp.*, *Asteraceae*) a vlašské ořechy (*Juglans regia* L., *Juglandaceae*). Isoflavonoidy byly prokázány i v čeledích *Iridaceae* a *Euphorbiaceae*. Jako alternativní zdroj isoflavonoidů by mohly být využívány zástupci rodu *Genista*.

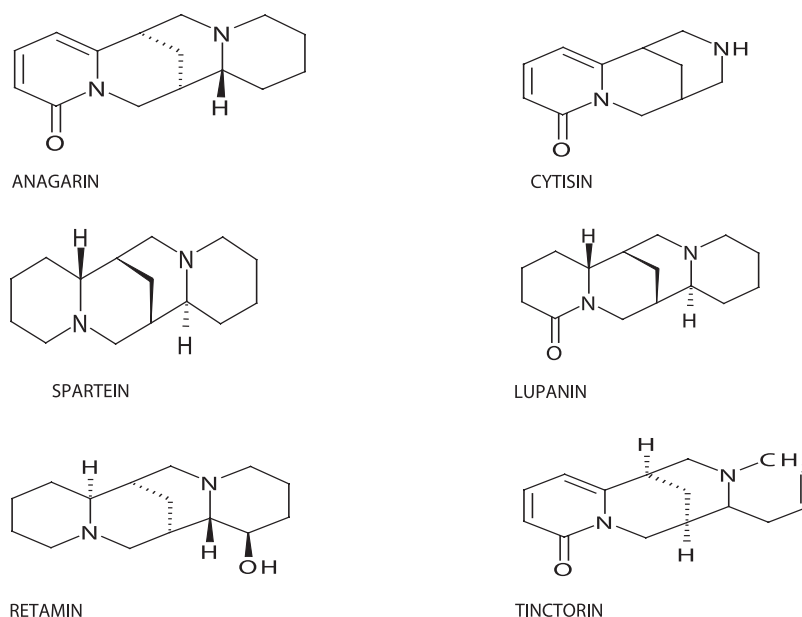
V nati *Genista tinctoria* byly HPLC analýzou prokázány tyto flavonoidy a isoflavonoidy: genistein 7-O -diglukosid; puerarin; 2'-hydroxygenistein 7-O-glukosid; daidzein; apigenin 7-O-glukosid; luteolin 7-O-glukosid; genistin; genistein 7-O-(6''malonyl)-glukosid; 3',4',7'-trihydroxyflavan; genistein 7-O-(6''-acetyl)-glukosid; ononin; 4',7'-dihydroxyisoflavan; daidzein; sissotrin; genistein; luteolin^{3, 15}). Obdobné flavonoidy byly proká-

zány i v jiných druzích tohoto rodu například v *Genista tricuspidata*, *G. aucherii*, *G. burdurensis*, *G. sadrasica*, *G. involucrata*, *G. vuralii*, *G. tenerea*, *G. morsii* a *G. epheroides*.

Při metabolizaci v gastrointestinálním traktu savců dochází k přeměně biochaninu A a formononetinu na genistein, resp. daidzein. Daidzein může být dále přeměněn na dihydrodaidzein a poté na *O*-desmethylangolensin a equol. Equol je metabolizován jednotlivými organismy velmi individuálně, což může být důvodem jistých rozdílů ve výsledcích studií estrogenních účinků isoflavonoidů. Genistein je lidským organismem metabolizován na dihydrogenistein a dále na 6'-hydroxy-*O*-desmethylangolensin a hormonálně inertní *p*-ethylfenol¹⁶) (obr. 2).

Chinolizidinové alkaloidy a jejich biologická aktivita

Chinolizidinové alkaloidy jsou charakteristické alkaloidy pro čeleď *Fabaceae*. Jsou budovány z lysinu, resp. jeho metabolického ekvivalentu, kadaverinu.



Obr. 3. Chemická struktura některých chinolidizinových alkaloidů

Lupinin vzniká ze dvou, spartein ze tří molekul tohoto prekursoru. Cytisin se považuje za štěpný produkt sparteinu. Terapeutický význam mají hlavně spartein a cytisin.

V rodu *Genista* prokázal Luczkiewicz tyto chinolidizinové alkaloidy: cytisin, retamin, L-isosparteín, methylcytisin, spartein. V intaktní rostlině *Genista tinctoria* prokázal cytisin, retamin, spartein a L-isosparteín. V kalusové kultuře *Genista tinctoria* byl stanoven pouze retamin a spartein¹⁷⁾. V literatuře se ještě zmiňuje obsah anagyrinu a lupaninu⁴⁾, Knöfel ve své studii uvádí také nový alkaloid tinctorin¹⁸⁾.

Biologická aktivita všech zmíněných alkaloidů není v literatuře podrobně popsána. U anagyrinu se zkoumá působení na RVS (respiratory syncytial virus)²⁰⁾. Cytisin působí jako agonista na neuronálních nikotinacetylcholinových receptorech, vykazuje také analgetický účinek, antihypertenzní a inotropní působení. Spartein působí jako profylaktikum předsíňových dysrytmií a sinusové tachykardie. Lupanin má baktericidní účinek na *Pseudomonas syringae* P.V. *tomato*, *Pseudomonas syringae* P.U. *phaselolica*, *Erurnia carotivora*, *Pseudomonas libida*²⁰⁾.

Izolace a stanovení obsahových látek *Genista tinctoria*

Quinuli Wu a Mingfu Wang ve své práci zkoumali optimální analytické metody pro stanovení obsahu estrogenů obsažených v rostlinách. Využívali zejména metody plynové chromatografie (GC), vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforézy (CE) propojené s UV, DAD, ED, fluorescenčním detektorem, MS a NMR a imunoanalýzu¹⁷⁾.

Kombinace GC s MS umožňuje velmi spolehlivou identifikaci a přesné stanovení obsahu fytoestrogenů a jejich metabolitů v rostlinném materiálu. I přes vysoko-

spolehlivost a citlivost této metody se kvůli vysokým nákladům na provoz tato kombinace nevyužívá. Častěji se využívá kombinace HPLC-MS, nebo HPLC s UV, DAD a fluorescenčními detektory. Fytoestrogeny mají ve struktuře minimálně 1 aromatický kruh s maximem UV absorpce v rozmezí 230–280 nm, proto lze k detekci použít UV detektor nebo dokonalejší detektor s nastavitelnou vlnovou délkou. Nevýhodou UV detekce je snížená citlivost a potřeba aplikace relativně vysoké koncentrace fytoestrogenů ve vzorku. Fluorescenční a elektrochemický detektor jsou mnohem citlivější^{17, 19)}.

Luczkiewicz používal k určení a stanovení komplexu isoflavonoidů a flavonů (volných aglykonů, monoglykosidů, diglykosidů a esterů) obsažených v *Genista tinctoria* HPLC s DAD UV a MS detektory. Zjistil, že použití tenkovrstvé chromatografie (TLC) s desintometrickou detekcí k analýze fytoestrogenů obsažených v *Genista tinctoria* je nevhodné stejně jako použití GC, které vyžaduje velice drahou derivatizaci látek^{3, 6, 13)}. Isoflavonoidy vykazují typické spektrum v UV oblasti. Luczkiewicz upozorňuje, že malonáty a acetáty isoflavonoidů vykazují signál ve stejné oblasti UV spektra jako glykosidy. MS detekce umožňuje komplexnější identifikaci sekundárních metabolitů. Glykosidy mají mnohem slabší odezvu než aglykony¹³⁾.

K HPLC separaci fytoestrogenů se obecně používají tyto mobilní fáze 80% methanol (MeOH) nebo acetonitril (CH₃CN, ACN) a voda s přidávkou malého množství kyseliny. Struktura fytoestrogenů a jejich metabolitů často obsahuje hydroxylové skupiny vázané na fenylech, které mají slabě kyselý charakter. Proto se přidává k mobilní fázi malé množství kyseliny – nejčastěji kyseliny mravenčí (HCOOH), octové (AcOH), trifluorooctové (TFA) a fosforečné (H₃PO₄)¹⁷⁾.

Luczkiewicz extrahoval isoflavonoidy z lyofilizovaného rostlinného materiálu. Rostlinný materiál byl

homogenizován v 80% methanolu a vzniklá suspenze zfiltrována. Pročištěný extrakt byl nastříknut do kolony.

Flavonoidy byly separovány gradientovou elucí s použitím mobilních fází: A (voda: AcOH, 99,9 : 0,1), B (ACN: AcOH, 99,9 : 0,1); Eluční profil: 0–35 min: 10 → 35% B v A; 35–80 min: 35 → 80% B v A. Průtok: 1,5 ml/min; Detekce byla prováděna při 262 nm ⁶⁾.

Mikelová ve své práci ke stanovení isoflavonoidů používala rovněž metodu HPLC s detekcí pomocí diodového detektoru. Extrakt ze soji (*Glycine max*) byl získán převedením rozemleté drogy do 80% methanolu a extrahováním za pomoci ultrazvuku. Nežádoucí interferující látky byly odstraněny na kolonách SPE (solid phase extraction). Isoflavony byly z kolony eluovány 60, 80, 100% MeOH s 2% hydroxidem amonným. Mobilní fáze: 0,3% HCOOH (v/v) a acetonitril v různých koncentracích (mobilní fáze A); Eluční profil: 0–20 min 10 → 20% A; 20–25 min 20 → 50% A; 30–45 min 60 → 10 % A; Průtok: 0,8 ml/min. Detekce byla prováděna při 254 nm ⁵⁾.

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem MSM 0021620822 a Projektem Specifického vysokoškolského výzkumu 2010-261-002.

LITERATURA

1. **Korbelář, J., Endris, Z.:** Naše rostliny v lékařství. Praha: Avicenum 1985; 216–217.
2. **Janča, J., Zentrich, J. A.:** Herbář léčivých rostlin, 2. díl. Praha: Eminent 1995; 264–267.
3. **Luczkiewicz, M., Migas, P., Kokotkiewicz, A., Walijewska, M., Ciszowski, W.:** Two-dimensional TLC with Adsorbent Gradient for Separation of Quinolidizine Alkaloids in the Herb and *in vitro* Cultures of several *Genista* Species. *Journal of Plant Chromatography* 2004; 17, 89–94.
4. **Resen, I., Veit, M.:** Simultaneous Determination of Phenolics and Alkaloids Using Ion Exchange Chromatography for sample. *Preparation Phytochemical Analysis*. 1995; 6, 121–124.
5. **Mikelová, R., Klejdus, B., Zehnálek, J., Vacek, J.:** Chromatografické stanovení isoflavonů ve vegetativních a generativních částech rostlin sóje (*Glycine max*). *CHEMmagazín* 2004; 14, 13–15.
6. **Luczkiewicz, M., Glód, D.:** Callus cultures of *Genista* plants-*in vitro* material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. *Plant Science* 2003; 165, 1101–1108.
7. **Bello, R., Barrachina, M. D., Martínez-Cuesta, M. A., Esplugues, J.:** Pharmacological Screening of the Methanol and Dichlormethanol Extracts of *Genista patens*. *Phytotherapy Research* 1995; 9, 495–499.
8. **Ososki, L. A., Kennelly, E. J.:** Phytoestrogens: a Review of the present state of research, *Phytotherapy Research* 2003; 17, 845–869.
9. **Jedinak, A., Farago, J., Psenakova, I., Maliar, T.:** Approaches to flavonoid production in plant tissue culture. *Biologia* 2004; 59, 697–710.
10. **Borges, C., Martinho, P., Martins, A., Rauter, A. P., Ferreira, M. A. A.:** Structural characterisation of flavonoids and flavonoid-O-glycosides extracted from *Genista tenerea* by fast atom bombardment tandem mass. *Rapid communications in mass spectrometry* 2001; 15, 1760–1767.
11. **Rainova, L., Nakov, N., Bogdanova, S., Minkov, E.:** Ulceroprotective activity of the flavonoids of *Genista rumelica* Vel. *Phytotherapy Research* 1988; 2, 137–139.
12. **Garritano, S., Pinto, B., Giachi, I., Pistelli, L., Reali, D.:** Assessment of estrogenic activity of flavonoids from Mediterranean plants using an *in vitro* short-term test. *Phytomedicine* 2005; 12, 143–145.
13. **Aaron, M. Rashotte, Hyun Sook Chae, Bridey, B., Maxwell, J., Kieber, J.:** The interaction of cytokinin with other signals. *Physiologia Plantarum* 2005; 123, 184.
14. **Dostál J.:** Nová květina ČSSR. 1. díl. Praha: Academia 1989; 516.
15. **Luczkiewicz, M., Glód, D., Bączek, T., Bucínski, A.:** LC-DAD UV and LC-MS for the Analysis of Isoflavones and Flavones from *in vitro* and *in vivo* biomass of *Genista tinctoria* L. *Chromatographia* 2004; 60, 179–185.
16. **Buton, B. J., Patel, N.:** Phytoestrogens for Osteoporosis. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* 2004; 2, 341–356.
17. **Wu, Q., Wang, M., Simon, J. E.:** Analytical methods to determine phytoestrogenic Compounds. *Journal of Chromatography B* 2004; 812, 325–355.
18. **Knöfel, D., Schütte, R. H.:** Chinolizidinalkaloide: Konstitution und Konfiguration von Tinctarin aus *Genista tinctoria*. *Journal für Praktische Chemie* 2004; 312, 887–895.
19. **Federici, E., Touché, A., Choquart, S., Avanti, O., Fay, L., Offord, E., Courtois, D.:** Hihg isoflavone content and estrogenic activity of 25-year old *Glycine max* tissue cultures. *Phytochemistry* 2003; 64, 717–724.
20. <http://faf.vfu.cz/html/index.2html> (staženo 15. 3. 2006).