

Liście *Serratula quinquefolia* M.B. nowym źródłem arbutyny

¹Katedra i Zakład Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. farm. Gerard Nowak

²Dział Informacji Naukowej, Phytopharm Kłęka SA, Nowe Miasto nad Wartą
Kierownik Działu: mgr Natalia Walas-Marcinek

THE LEAVES OF *SERRATULA QUINQUEFOLIA* M.B.
AS A NEW ARBUTIN SOURCE

SUMMARY

Arbutin – glycosylated hydroquinone, is a natural compound occurring in several species of Ericaceae, Lamiaceae, Saxifragaceae, Rosaceae, Caprifoliaceae. The compound has also been found in the aerial parts of several species of the *Serratula* (Asteraceae) genus, including *S. quinquefolia* M.B., a plant grown in the Medicinal and Cosmetic Herbs Garden of Department of Medicinal and Cosmetic Natural Products, Poznań University of Medical Sciences, Poland. The species occurs naturally in wooded areas at the height of 300-1000 m. above sea level, mainly in the region of the Caucasus. It is also common in the meadows of Armenia, Azerbaijan, Greece, Iran and south-west Russia. Our research proves that the aerial parts of *Serratula quinquefolia* contain constant high concentration of β -arbutin. A measured by HPLC, it is 6.86% according to The European Pharmacopoeia. Such parameters substantiate considering the raw material in question valuable for medicine and cosmetology on account of the well-known antibacterial and whitening properties of arbutin. In the water and methanolic extracts from *S. quinquefolia* no hydroquinone nor its derivatives (excluding arbutin) have been traced. Our methods of isolation have also shown no occurrence of ecdysones in the aforementioned raw materials.

KEY WORDS: ARBUTIN – *SERRATULA* – *QUINQUEFOLIA* – HPLC

Wstęp

Charakterystyka botaniczna *Serratula quinquefolia*

Serratula quinquefolia M.B. (sierpik pięciolistny) zaliczany jest do plemienia *Cardueae*, podplemienia *Centaureinae* (*Asteraceae*). Jest rośliną wieloletnią, silnie rozgałęzioną, dorastającą do 2 metrów wysokości, o nieparzystopierzastych liściach, złożonych z 3 do 5 listków o kształcie jajowato-podługim lub podłużnie-lancetowatym (ryc. 1).

Dolne liście sierpika pięciolistnego są ogonkowe, o jajowatych lub podługich, piłkowanych, spiczastych

i szerokich blaszkach, wydłużonych ku nasadzie. Roślina ta ma liczne koszyczki kwiatowe o szerokości od 1 do 1,5 cm, położone na ulistnionych pędach kwiatowych. Łuski okrywki koszyczka ściśle i dachówkowato przylegają do siebie, są ostro zakończone, na brzegu wywinięte i orzęsione (ryc. 2).

Wśród nazw synonimowych tego gatunku pojawia się nazwa *Klasea quinquefolia* (M. Bieb.) Cass., sugerująca zaliczenie go do innego rodzaju, pokrewnego *Serratula* lub do sekcji *Klasea* w rodzaju *Serratula* (1). Przeprowadzone analizy fitochemiczne sierpików wykazały, że wśród nich występują ekdysony i/lub arbutyna. Wydaje się, że arbutyna może być markerem chemotaksonomicznym, której obecność w częściach nadziemnych roślin może uzasadniać włączenie ich do osobnego rodzaju *Klasea* (2).

S. quinquefolia występuje w takich krajach jak Armenia, Azerbejdżan, Grecja, Iran, Turcja oraz południowo-zachodnia Rosja. W naszych warunkach klimatycznych rośnie dobrze, nie jest rośliną wymagającą, po 4 sezonach wegetacyjnych osiąga 1,5 m wysokości.



Ryc. 1. Liście dolne *Serratula quinquefolia* (zdj. wykonane w Ogrodzie Kat. i Zakł. Nat. Sur. Leczn. i Kosmetycznych UMP).



Ryc. 2. Kwiatostan *Serratula quinquefolia* (zdj. wykonane w Ogrodzie Kat. i Zakł. Nat. Sur. Leczn. i Kosmetycznych UMP).

Właściwości farmakologiczne arbutyny

Arbutyna jest uznanym składnikiem kosmetycznym, przeznaczonym do rozjaśniania przebarwień skóry wywołanych zmianami zapalnymi oraz wzmożoną aktywnością melanocytów. Wykazano, że arbutyna jest związkiem bezpiecznym i efektywnym w eliminowaniu zmian barwnikowych, takich jak piegi (*ephelides*), ostuda (*chloasma*), czy plamy soczewicowate (*lentiginos*) (3-6), głównie przez hamowanie aktywności tyrozynazy, a co za tym idzie poprzez zmniejszenie biosyntezy melaniny w melanocytach (3, 7).

Tyrozynaza jest kluczowym enzymem procesu biosyntezy melaniny. Odpowiada ona za katalizę dwóch pierwszych reakcji syntezy: hydroksylację tyrozyny do 3-(3,4-dihydroksyfenylo)-alaniny (DOPA) i oksydację DOPA do dopachinonu, czyli hydroksylację monofenolu i przekształcenie *o*-difenolu do *o*-chinonu (8-11). Enzym ten posiada dwa miejsca aktywne: jedno dla wiązania L-tyrozyny, drugie dla wiązania L-DOPA (3, 12). Tyrozynaza złożona jest z trzech domen białkowych. W domenie środkowej znajduje się sześć reszt histydyny, odpowiedzialnych za wiązanie jonów miedzi. Każdy jon miedzi tworzy w miejscu aktywnym enzymu kompleksy z trzema

resztami histydyny, które są niezbędne do prawidłowego przebiegu reakcji enzymatycznej (13, 14).

Wśród roślinnych surowców leczniczych, zawierających w swym składzie glikozyd fenolowy – arbutynę, wymienić można liść mącznicy lekarskiej (*Uvae ursi folium*) i liść borówki brusznicy (*Vitis idaeae folium*). Oba surowce znalazły szerokie zastosowanie w leczeniu zakażeń dróg moczowych, przewlekłego zapalenia pęcherza moczowego oraz kamicy nerkowej (15, 16). Liść mącznicy lekarskiej jest wymieniany jako środek odkażający drogi moczowe w farmakopeach narodowych wielu krajów świata (15). Składnikami czynnymi liści mącznicy lekarskiej są glikozydy fenolowe: arbutyna, metyloarbutyna, galoiloarbutyna oraz hydrochinon i metylohydrochinon. Według FP VI surowiec powinien zawierać nie mniej niż 8% pochodnych hydrochinonu, w przeliczeniu na arbutynę (17).

W licznych badaniach *in vitro* potwierdzono właściwości przeciwbakteryjne liści mącznicy lekarskiej. Surowiec okazał się skuteczny w zwalczaniu zakażenia spowodowanego *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella*, *Shigella sonnei* i *S. flexneri* (15, 18, 19).

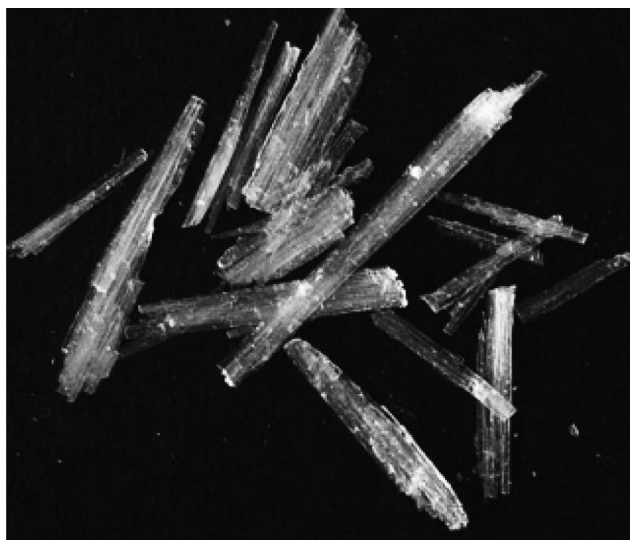
Przeciwbakteryjne właściwości liści mącznicy lekarskiej są związane z aktywnością produktów hydrolizy arbutyny – hydrochinonu. Po spożyciu surowca arbutyna jest hydrolizowana przez β -glukozydazę do aglikonu, który tworzy z kwasem glukuronowym lub kwasem siarkowym estrowe pochodne, ulegające ponownemu rozkładowi w środowisku zasadowym moczu (pH = 8). Powstałe w tym środowisku związki wykazują silne działanie przeciwbakteryjne. Maksymalne ich działanie obserwowane jest po upływie 3-4 godzin od momentu podania surowca. Istotnym warunkiem jego skutecznego działania jest zapewnienie słabo zasadowego odczynu moczu poprzez podawanie wodorowęglanu sodu oraz stosowanie odpowiedniej diety roślinnej (15, 20).

Materiał i metody

Izolacja i identyfikacja dominującego związku z liści Serratula quinquefolia

310 g wysuszonych i rozdrobnionych liści sierpika pięciolistnego (zebrane w lipcu 2010 r.), uprawianego w Ogrodzie Katedry i Zakładu Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych UM w Poznaniu ekstrahowano 3-krotnie metanolem. Zagęszczony do odpowiedniej objętości wyciąg alkoholowy stanowił

materiał do dalszych analiz izolacyjnych. Jego rozdzielanie dokonano metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (Kieselgel 60 Nr 7733 Merck) przy użyciu chlorku metylenu i metanolu jako fazy wymywającej, zaczynając od proporcji odpowiednio 20:1, a następnie zwiększając polarność układu, przez stopniowe dodawanie metanolu. Uzyskane frakcje, charakteryzujące się brązowym zabarwieniem na kontrolnych chromatogramach, spryskanych odczynnikami anizowym i wyróżniające się dużą siłą krystalizacji, oddzielono od rozpuszczalnika i przemywano chlorkiem metylenu. Kilka sąsiednich frakcji na kontrolnych chromatogramach wykazywało obecność tego samego związku, ale ilość zanieczyszczeń nie pozwalała na jego krystalizację. Oczyszczono go zatem metodą rechromatografii (Kieselgel 60, Nr 7729 Merck) w sposób wyżej opisany.



Ryc. 3. Kryształy wyizolowanego związku (zidentyfikowanego następnie jako β -arbutyna).

Wyniki

Chromatograficznie jednorodne kryształy (skontrolowane metodą TLC) połączone i zważono. Razem uzyskano 14,69 g białych kryształów w kształcie długich igieł (ryc. 3), o temperaturze topnienia 199,5°C.

Identyfikacja wyizolowanych kryształów

Otrzymany związek zidentyfikowano metodą ko-chromatografii i metodami spektralnymi – ^1H NMR i ^{13}C NMR (tab. 1 i 2).

Na widmie ^1H NMR są widoczne sygnały świadczące o obecności pierścienia benzenowego w badanym związku (6,98 i 6,84 ppm) i sygnały pomiędzy 2 i 5 ppm, charakterystyczne dla cząsteczki glukozy (ugrupowania CH-OH), a także sygnał protonu – dublet przy 4,72 ppm, przy stałej sprzężenia $J = 7,7$ Hz, który wskazywał na położenie α protonu

Tabela 1. Sygnały widma magnetycznego rezonansu węglowego izolowanego związku.

Izolowany związek (CD ₃ OD, 600 MHz)	
¹³ C	δ [ppm]
C-1	153,7
C-4	152,3
C-2,C-6	119,3
C-3, C-5	116,6
C-1'	103,6
C-3'	78,07
C-5'	78,02
C-2'	75,0
C-4'	71,5
C-6'	62,0

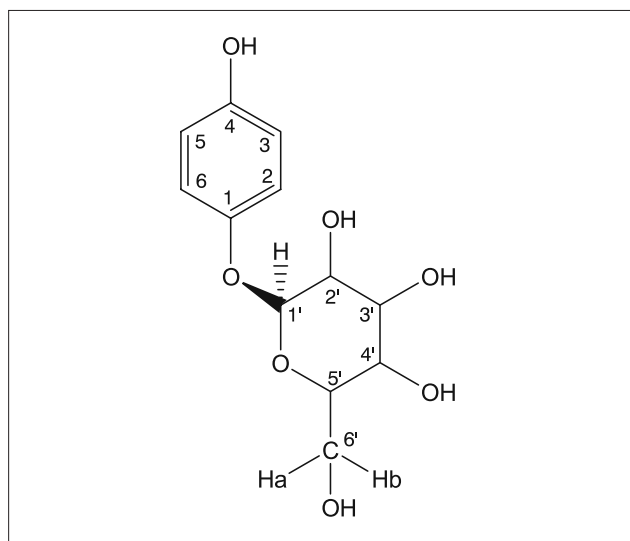
Objaśnienia: δ – przesunięcia chemiczne

Tabela 2. Sygnały widma protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego otrzymanego związku.

Izolowany związek (CD ₃ OD, 600 MHz)		
¹ H	δ [ppm/Hz]	J [Hz]
H-2,H-6	6,98 d	J _{2,3} , J _{6,5} = 9,1
H-3, H-5	6,84 d	J _{3,2} , J _{5,6} = 9,1
H-1'	4,72 d	J _{1',2'} = 7,7
H-6'a	3,86 dd	J _{6'a, 6'b} = 12,4
H-6'b	3,71 dd	J _{6'a,5'} = 5,6
H-2'-H-5'	3,53-3,25 m	J _{6'b, 6'a} = 12,4 J _{6'b,5'} = 5,6

Objaśnienia: δ – przesunięcie chemiczne; J – stała sprzężenia; d – dublet, dd – dublet dubletów; m – multiplet

przy węglu C1'. Na widmie protonowym widoczne były także charakterystyczne sygnały (dd 3,86 ppm i dd 3,71 ppm), świadczące o obecności ugrupowania CH₂OH w glukozie. Na podstawie ko-chromatografii, temperatury topnienia i widma protonowego otrzymanego związku stwierdzono, że jest nim β-arbutyna (ryc. 4). Sugestie te potwierdziły widma węglowe i węglowo-protonowe COSY. Wykonano również analizy krystalograficzne (21), aby ostatecznie i jednoznacznie udowodnić, że otrzymany związek jest czystym β-epimerem, a nie mieszaniną α- i β-arbutyny (2).



Ryc. 4. Struktura β-arbutyny.

Analiza ilościowa arbutyny w liściach i ziele sierpika pięciolistnego

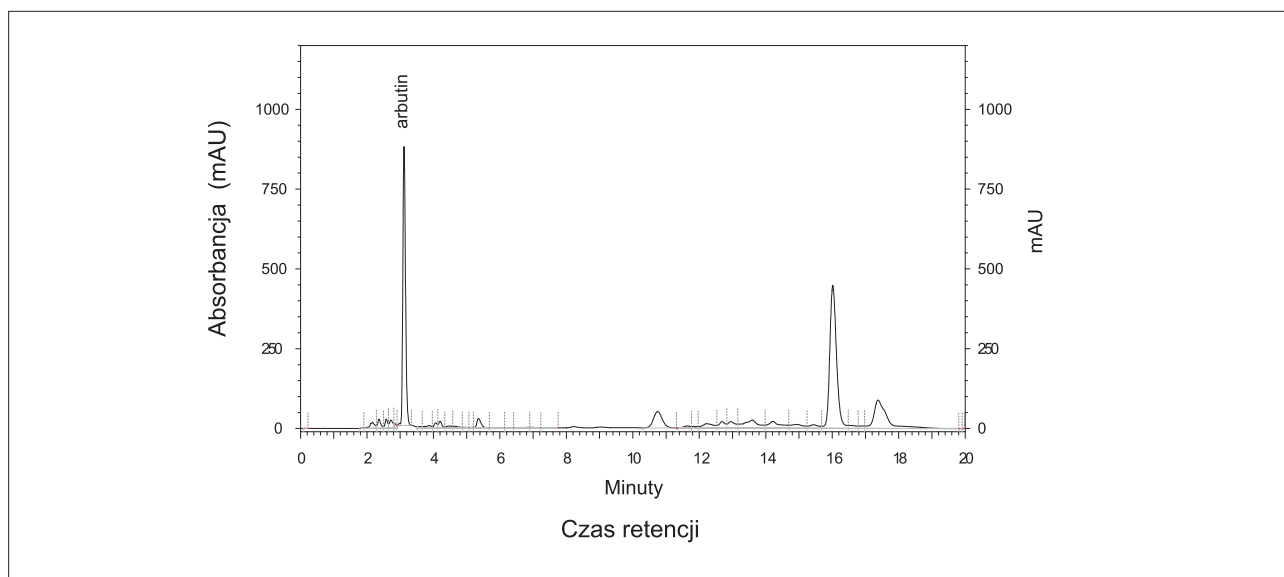
Oznaczenie zawartości arbutyny w wyciągu wodnym z liści sierpika pięciolistnego wykonano metodą HPLC w laboratorium fitochemicznym firmy Phytopharm Kłęka S.A., według monografii dla liści mącznicy lekarskiej (*Uvae ursi folium*), opisaną w Farmakopei Europejskiej 6.1 (04/2008:1054). Widmo β-arbutyny rejestrowano przy użyciu aparatu LaChrom Elite firmy VWR-Hitachi. Otrzymany w wyniku rozdziału pik chromatograficzny zidentyfikowano jako widmo β-arbutyny (ryc. 5).

Na chromatogramie wodnego wyciągu z liści sierpika pięciolistnego nie stwierdzono obecności hydrochinonu. Analiza HPLC wykazała, że średnia zawartość β-arbutyny w liściach sierpika pięciolistnego wynosi 6,86% (według pierwszego oznaczenia 6,81% i drugiego 6,91%).

Oprócz analizy HPLC liści wykonano także pomiar zawartości β-arbutyny w ziele sierpika pięciolistnego, zebranego i wysuszonego w lipcu 2010 roku. Przy zastosowaniu identycznych warunków pomiaru, jakich użyto przy oznaczeniach przedstawionych wyżej, wykazano, że w ziele znajduje się 6,71% β-arbutyny.

Dyskusja

Arbutyna – glukopiranozyd hydrochinonu, jest naturalnym związkiem występującym w niektórych gatunkach rodzin *Ericaceae*, *Lamiaceae*, *Saxifragaceae*, *Rosaceae* i *Caprifoliaceae*. Związek ten



Ryc. 5. Widmo HPLC wyciągu z sierpika pięciolistnego.

znajdowano także w częściach nadziemnych niektórych gatunków rodzaju *Serratula* (*Asteraceae*), włączając *S. quinquefolia*, roślinę rosnącą w Ogrodzie Roślin Leczniczych, Katedry i Zakładu Naturalnych Surowców Leczniczych i Kosmetycznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Gatunek ten w naturze spotykany jest na terenach leśnych na wysokości 300-1000 m n.p.m., głównie w rejonie Kaukazu. Występuje także powszechnie na łąkach Armenii, Azerbejdżanu, Grecji, Iranu, Turcji oraz południowo-zachodniej Rosji. Badania nasze wykazały, że części nadziemne *Serratula quinquefolia* zawierają stałe wysokie stężenie β -arbutyny. Zawartość tego związku określona metodą HPLC, według Farmakopei Europejskiej, wynosi 6,86%. Takie parametry uzasadniają uznanie omawianego surowca za wartościowy pod względem medycznym i kosmetycznym, ze względu na znane – przeciwbakteryjne i wybielające właściwości arbutyny.

Wnioski

1. Uzyskane wyniki sugerują, że w częściach nadziemnych sierpika pięciolistnego jest stała zawartość arbutyny, co pozwala na uznanie go za surowiec arbutynowy.
2. Stosowane przez nas metody izolacyjne nie wykazały obecności ekdysonów w badanym surowcu roślinnym.
3. Brak hydrochinonu, a także wysokie stężenie arbutyny w liściach *S. quinquefolia*, wskazuje na możliwość skutecznego i bezpiecznego stosowania ekstraktów z tego surowca w preparatach farmaceutycznych i kosmetycznych.

Piśmiennictwo

1. Martins L. Systematics and biogeography of *Klasea* (*Asteraceae-Cardueae*) and a synopsis of the genus. *Bot J Linn Soc* 2006; 152:435-64. 2. Nowak G, Nawrot J, Latowski K. Arbutin

in *Serratula quinquefolia* M.B. (*Asteraceae*). *Acta Soc Bot Pol* 2009; 78:137-40. 3. Maeda K, Fukuda M. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276:765-9. 4. Chakraborty AK, Funasaka Y, Komoto M i wsp. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res* 1998; 11:208-12. 5. Sugai T. Clinical effects of arbutin in patients with chloasma. *Skin Res* 1992; 34: 522-9. 6. Tomita K, Fukuda M, Kawasaki K. Mechanism of arbutin inhibitory effect on melanogenesis and effect on the human skin with cosmetic use. *Fragrance* 1990; 6:72-7. 7. Yang ZQ, Wang ZH, Tu JB i wsp. The mixture of aloesin and arbutin can significantly inhibit the tyrosinase activity and melanogenesis of cultured human melanocytes. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2004; 20:369-71. 8. Robb DA. Tyrosinase. [In:] Lontie R. (red.). *Cooper proteins and cooper enzymes*, vol. II. CRC Press, Florida 1984; 207-40. 9. Kubo I, Kinoshita H, Chaudhuri SK i wsp. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg Med Chem* 2000; 8:1749-55. 10. Pérez-Gilbert M, Garcia-Carmona F. Dimethyl sulfide, a volatile flavor constituent, is a slow – binding inhibitor of tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285:257-61. 11. Shin NH, Ryu SY, Choi EJ i wsp. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on DOPA oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243:801-3. 12. Hearing VJ, Tsukamoto K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J* 1991; 5:2902-9. 13. Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:1707-23. 14. Tripanthi RK, Hearing VJ, Urabe K i wsp. Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *J Biol Chem* 1992; 267:23707-12. 15. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. *Herbal medicine: expanded Commission E monographs*. Thieme, Stuttgart – New York 2000; 389-91. 16. Weiss RF. *Weiss's herbal medicine*. Thieme, Stuttgart – New York 2001; 223-4. 17. Farmakopea Polska VI. *Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne*, Warszawa 2002. 18. Moskalenko S. Preliminary screening of far-eastern ethnomedical plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 1986; 15:231-59. 19. Ng TB, Ling JM, Wang ZT i wsp. Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptide for antibacterial activity. *Gen Pharma* 1996; 27:1237-40. 20. Nawrot J. *Fitoterapia układu moczowego*. [W:] Nowak G. (red.). *Leki pochodzenia naturalnego UMP*, Poznań 2012; 251-62. 21. Nycz JE, Małecki G, Morağ M i wsp. Arbutin: Isolation, X-ray structure and computational studies. *J Mol Struct* 2010; 980:13-7.

otrzymano/received: 08.10.2012
zaakceptowano/accepted: 29.11.2012

Adres/address:

*prof. dr hab. n. farm. Gerard Nowak
Katedra i Zakład Naturalnych Surowców
Leczniczych i Kosmetycznych
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Mazowiecka 33, 60-623 Poznań
tel.: +48 (61) 848-04-75
e-mail: gnowak@ump.edu.pl