

*Bogdan Kędzia, Elżbieta Hołderna-Kędzia, Katarzyna Seidler-Łożykowska,
Waldemar Buchwald, Anna Krajewska-Pattan, Agnieszka Gryszczyńska,
Aurelia Pietrowiak, Bogna Opala, Wojciech Białas

Aktywność antybiotyczna i skład chemiczny ekstraktów otrzymanych z ziela i siewek *Chelidonium majus* L.

Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu
Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. Grzegorz Szychalski

ANTIBIOTIC ACTIVITY AND CHEMICAL
COMPOSITION OF EXTRACTS OBTAINED FROM
HERB AND SEEDLINGS OF CHELIDONIUM MAJUS L.

SUMMARY

The assumption of work was the obtaining of crude drugs with a high contents of biological active compounds by extantions with a high antibiotic activity. To the studies was used the cultivation of greater celandine (*Chelidonium majus* L.) also breeding of seedlings of this plant in vivo. The studies included ethanolic and aqueous extracts from herb and seedlings of *Chelidonium majus* L. also non-protein and protein fractions obtained from aqueous extracts of above mentioned crude drugs. They were analysed in respect of antibiotic activity and occurrence of contents of alkaloids and flavonoid compounds. The highest antibiotic activity have ethanolic extracts of *Chelidonium majus* L., lesser aethanolic extracts from seedlings and the lowest protein and non-protein fractions obtained from aqueous extracts obtained from this plant. The antibiotic activity of extracts and fractions determined alkaloids and flavonoids occurring in *Chelidonium majus* L. Moreover was showed, that selected aethanolic extract from herb of *Chelidonium* (herb of autumnal rosette of leaves) has a high antibiotic activity and could be used in medical practice to wound healing and burns infected including *Staphylococcus resistant for meticillin*.

KEY WORDS: CHELIDONIUM MAJUS HERB – EXTRACTS
– ANTIBIOTIC ACTIVITY – CHEMICAL COMPOUNDS
– MEDICAL PRACTICE

Wstęp

Ekstrakty, frakcje i wyizolowane substancje biologicznie aktywne z glistnika jaskółczego ziela (*Chelidonium majus* L.) odznaczają się działaniem przeciwbakteryjnym, przeciwwgrzybiczym, przeciwwirusowym,

przeciwpierwotniakowym i przeciw pasożytniczym. Przegląd przeciwdrobnoustrojowego działania tej rośliny opisano we wcześniejszej pracy (1).

Skład chemiczny omawianej rośliny, w tym występowanie w niej alkaloidów, flawonoidów i białek także szczegółowo udokumentowano we wcześniejszym opracowaniu (2).

Cel pracy

Założeniem prezentowanej pracy było uzyskanie surowca o wysokiej zawartości związków biologicznie aktywnych, a co za tym idzie o wysokiej aktywności antybiotycznej. W tym celu do badań wykorzystano uprawę gruntową glistnika oraz hodowlę siewek w warunkach *in vivo*.

Badaniami objęto ekstrakty etanolowe i wodne z ziela i siewek glistnika oraz frakcje białkowe i niebiałkowe otrzymane z ekstraktów wodnych wymienionych surowców. Analizowano je pod względem aktywności antybiotycznej oraz występujących w nich związków alkaloidowych i flawonoidowych.

Założono także działanie najbardziej aktywnego antybiotycznie ekstraktu etanolowego uzyskanego z ziela glistnika na bakterie chorobotwórcze występujące w środowisku szpitalnym.

Materiał i metody

Pozyskiwanie surowców

Wartość biologiczną ziela glistnika określano w ramach upraw gruntowych polskiej tetraploidalnej od-

Niniejsza praca została wykonana w ramach projektu badawczego N N405 677740 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w Krakowie.

miany Cynober. Uprawę glistnika założono w 2010 r. metodą wysiewu nasion do gruntu w terminie jesienim na poletkach o powierzchni 12 m².

Do badań ziele glistnika zbierano w dwóch sezonach wegetacyjnych (2011 i 2012 r.) w 6 fazach fenologicznych: rozety liściowej wiosennej, początku kwitnienia roślin, pełni kwitnienia roślin, zielonego owocu (strąka), pełnej dojrzałości nasion i rozety liściowej jesiennej. Surowiec po zbiorze suszono w temp. 60°C.

Hodowlę siewek *in vivo* prowadzono przy użyciu nasion otrzymanych z uprawy gruntowej (zbioru dokonanego w 2010 r.) tej samej odmiany glistnika (Cynober). Na tę formę surowca zdecydowano się po uprzednich niepowodzeniach z uzyskaniem ziela z kalusa i nasion hodowanych na pożywkach sztucznych.

Nasiona glistnika wysiewano do doniczek z jałową glebą i elicytowano je frakcjonowanym wyciągiem drożdżowym. Rośliny zbierano po 7 dniach wegetacji i suszono w temp. pokojowej.

Otrzymywanie ekstraktów i frakcji

Do sporządzania ekstraktów etanolowych używano wysuszonego i rozdrobnionego ziela (sito 5,6 mm). Surowiec ekstrahowano 50% etanolem w stosunku 1:10. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. 50°C i wymrożeniu do -50°C ekstrakt poddawano liofilizacji.

Ekstrakty wodne otrzymywano z wysuszonego i rozdrobnionego surowca (sito 0,315 mm), który poddawano działaniu wody oczyszczonej przez 3 godz. w temp. 90°C w stosunku 1:10. Po ochłodzeniu ekstrakt sączone przez watę i gazę, oddestylowywano połowę rozpuszczalnika, wymrażano do -50°C i poddawano liofilizacji.

W celu przygotowania frakcji białkowych i niebiałkowych wysuszony i rozdrobniony surowiec (sito 1,0 mm) umieszczano w komorze ekstraktora i zalewano wodą destylowaną w stosunku 1:10. Ekstrakcję prowadzono w temp. 90°C przez 3 godziny. Po ochłodzeniu i przesączeniu przez sito stalowe i filtr bawełniany, połowę rozpuszczalnika oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. 50°C. Z zagęszczonego ekstraktu białka wytrącano acetonem w stosunku 1:4 w temp. -20°C przez 30 minut. Frakcję białkową odwirowywano (4500 obr./min) w temp. 4°C przez 20 min i po zawieszeniu w wodzie destylowanej liofilizowano (wydajność ok. 78%). Supernatant (frakcja niebiałkowa) zagęszczono dziesięciokrotnie w wyparce próżniowej i liofilizowano w warunkach podanych powyżej.

Oznaczenia fitochemiczne

W ekstraktach etanolowych i wodnych otrzymanych z ziela i siewek glistnika oraz we frakcjach białkowych

i niebiałkowych uzyskanych z ekstraktów wodnych tych surowców oznaczano ogólną zawartość alkaloidów (w przeliczeniu na chelidoninę) oraz ogólną zawartość flawonoidów (w przeliczeniu na kwercetynę). Oznaczenia prowadzono w oparciu o monografię surowca (*Chelidonii herba*) zawartą w Farmakopei Europejskiej 6 (3).

Oznaczenia ilościowe alkaloidów typu benzofenantrydyny (chelidonina, chelerytryna, sangwinaryna) oraz typu protoberberyny (koptyzyna, berberyna) prowadzono metodą HPLC DAD przy użyciu urządzenia Agilent 1100, natomiast oznaczenia ilościowe flawonoidów – metodą spektrofotometryczną.

Określanie aktywności antybiotycznej

Badane ekstrakty i frakcje w ilości 100 mg rozpuszczano w 1 ml dimetylosulfotlenku (DMSO). Z uzyskanych roztworów podstawowych (o stężeniu 100 mg/ml) przygotowywano następnie w podłożu bakteriologicznym Antibiotic Broth (Merck) rząd rozcieńczeń w zakresie stężeń 0,5-15 mg/ml. Do każdego rozcieńczenia ekstraktu lub frakcji o objętości 1 ml dodawano po 0,1 ml 18-godz. hodowli płynnej szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, rozcieńczonej 1:10 000 w tym samym podłożu (liczba dodawanych komórek wynosiła ok. 10³ w 0,1 ml). Inkubację próbek prowadzono w temp. 37°C przez okres 24 godzin. Po tym czasie ze wszystkich rozcieńczeń ekstraktu lub frakcji wykonywano posiewy na stałe podłoże Antibiotic Agar. Po dalszych 24 godzinach określano rozcieńczenia próbki, które całkowicie hamowały rozwój szczepu wzorcowego. Rozcieńczenia te odpowiadały najmniejszemu stężeniu bakteriobójczemu ekstraktu lub frakcji (ang. *Minimal Bactericidal Concentration* – MBC). Wartości te przeliczano z kolei na jednostki antybiotyczne (JA), przyjmując, że są one równe 1 JA. Wyniki podawano w odniesieniu do 1 g badanego ekstraktu lub frakcji. Dla przykładu MBC określone dla szczepu wzorcowego jako 1,0 mg/ml wskazuje, że 1 g ekstraktu lub frakcji odznacza się aktywnością antybiotyczną równą 1000 JA.

W przypadku aktywności antybiotycznej wybranego ekstraktu etanolowego z ziela glistnika wobec bakterii chorobotwórczych pochodzących z materiału klinicznego, w badaniach użyto 19 bakterii Gram-dodatnich i 11 bakterii Gram-ujemnych izolowanych od pacjentów znajdujących się na oddziałach szpitalnych. Drobnoustroje izolowano z ran i oparzeń o różnej etiologii. Część z nich wykazywała oporność na metycylinę. Badania prowadzono według powyżej opisanej metodyki, określając dla tych szczepów bakterii MBC oraz przeliczając wyniki na odpowiednie JA.

Wyniki badań

Aktywność antybiotyczna i skład chemiczny ekstraktów z ziela glistnika

Przeprowadzone badania wskazują, że aktywność antybiotyczna ekstraktów etanolowych we wszystkich 6 fazach fenologicznych ziela glistnika była wyższa w porównaniu do analogicznych ekstraktów wodnych uzyskanych w trakcie rozwoju tej rośliny (tab. 1 i 2). Wyniki te są o tyle wiarygodne, ponieważ są one wartościami średnimi z dwóch kolejnych lat wegetacji. Z badań wynika, że aktywność antybiotyczna ekstraktów etanolowych jest ok. 2,6 raza wyższa od aktywności ekstraktów wodnych.

Podobnie ekstrakty etanolowe sporządzone z ziela reprezentującego poszczególne fazy fenologiczne są o ok. 2,5 raza bardziej bogate w alkaloidy i o ok. 1,7 raza bardziej zasobne we flawonoidy, w porównaniu do odpowiadających sobie ekstraktów wodnych (tab. 1 i 2).

Do najbardziej aktywnych antybiotycznie i zawierających najwyższą zawartość związków alkaloidowych i flawonoidowych należy zaliczyć ekstrakt etanolowy uzyskany z ziela rozety liściowej jesiennej (VI faza fenologiczna) (tab. 1). Stąd ziele z rozety liściowej jesiennej, pozyskanej z uprawy w 2012 r., posłużyło do otrzymania ekstraktu etanolowego przeznaczonego do badań mikrobiologicznych z użyciem szczepów bakterii chorobotwórczych izolowanych z materiału szpitalnego.

Aktywność antybiotyczna i skład chemiczny ekstraktów z siewek glistnika

Wyniki badań przedstawione w tabeli 3 wskazują, że ekstrakt etanolowy oraz ekstrakt wodny z siewek glistnika odznaczają się przybliżoną aktywnością antybiotyczną, jaką reprezentują analogiczne ekstrakty z faz fenologicznych ziela glistnika (tab. 1 i 2). Podobnie kształtuje się ogólna zawartość alkaloidów i flawonoidów w tych ekstraktach (tab. 1-3).

Tabela 1. Aktywność antybiotyczna oraz ogólna zawartość alkaloidów i flawonoidów w ekstraktach etanolowych otrzymanych z ziela glistnika zebranego w fazach fenologicznych w dwóch kolejnych latach wegetacji (wartości średnie).

Fazy fenologiczne ziela glistnika	Aktywność antybiotyczna (JA)	Ogólna zawartość alkaloidów (mg/100 g)	Ogólna zawartość flawonoidów (mg/100 g)
Rozeta liściowa wiosenna	525	665	325
Początek kwitnienia roślin	600	740	300
Pełnia kwitnienia roślin	525	1100	545
Zielony owoc (strąk)	650	1285	490
Pełna dojrzałość nasion	825	1690	630
Rozeta liściowa jesienna	1025	1850	740

Tabela 2. Aktywność antybiotyczna oraz ogólna zawartość alkaloidów i flawonoidów w ekstraktach wodnych otrzymanych z ziela glistnika zebranego w fazach fenologicznych w dwóch kolejnych latach wegetacji (wartości średnie).

Fazy fenologiczne ziela glistnika	Aktywność antybiotyczna (JA)	Ogólna zawartość alkaloidów (mg/100 g)	Ogólna zawartość flawonoidów (mg/100 g)
Rozeta liściowa wiosenna	150	275	165
Początek kwitnienia roślin	300	320	215
Pełnia kwitnienia roślin	200	310	230
Zielony owoc (strąk)	275	575	340
Pełna dojrzałość nasion	275	615	350
Rozeta liściowa jesienna	425	595	405

Tabela 3. Aktywność antybiotyczna oraz ogólna zawartość alkaloidów i flawonoidów w ekstraktach etanolowych i wodnych z siewek glistnika.

Ekstrakty z siewek	Aktywność antybiotyczna (JA)	Ogólna zawartość alkaloidów (mg/100 g)	Ogólna zawartość flawonoidów (mg/100 g)
Etanolowy	650	925	320
Wodny	200	480	100

Aktywność antybiotyczna i skład chemiczny frakcji białkowych i niebiałkowych uzyskanych z ekstraktów wodnych z ziela i siewek glistnika

Dane przedstawione w tabeli 4 wskazują, że zarówno aktywność antybiotyczna, jak i zawartość substancji alkaloidowych i flawonoidowych we frakcjach białkowych i niebiałkowych otrzymanych z ekstraktów wodnych z ziela i siewek glistnika, są o wiele niższe w porównaniu do ekstraktów etanolowych i wodnych uzyskanych z ziela i siewek tej rośliny (tab. 1-3). Na podstawie zaprezentowanych wyników można także przypuszczać, że za aktywność antybiotyczną tych frakcji odpowiadają także inne substancje biologicznie czynne niż alkaloidy i flawonoidy, m.in. kwasy fenolowe i ich estry.

Działanie ekstraktu etanolowego z ziela glistnika na drobnoustroje chorobotwórcze izolowane ze środowiska szpitalnego

Przeprowadzone badania wykazały, że wyselekcjonowany ekstrakt etanolowy z ziela glistnika odznaczał się działaniem antybiotycznym wobec wszystkich bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych wyizolowanych z ran i oparzeń, w tym na szczepy *Staphylococcus aureus* oporne na metycylinę (MRSA), w granicach 80-1000 JA (tab. 5 i 6). A zatem w odpowiednich stężeniach (od 1 do 12,5 mg/ml) ekstrakt ten działa bakteriobójczo na badane szczepy bakterii chorobotwórczych i teoretycznie w stężeniu wyższym od 1,25% mógłby znaleźć zastosowanie w praktyce medycznej do

Tabela 4. Aktywność antybiotyczna oraz ogólna zawartość alkaloidów i flawonoidów we frakcjach białkowych i niebiałkowych uzyskanych z ekstraktów wodnych z ziela i siewek glistnika.

Badany surowiec i frakcje	Aktywność antybiotyczna (JA)	Ogólna zawartość alkaloidów (mg/100 g)	Ogólna zawartość flawonoidów (mg/100 g)
Ziele			
Frakcja białkowa	200	275	200
Frakcja niebiałkowa	400	300	180
Siewki			
Frakcja białkowa	100	80	10
Frakcja niebiałkowa	200	240	30

Tabela 5. Działanie ekstraktu etanolowego z ziela glistnika na bakterie Gram-dodatnie wyizolowane z materiału klinicznego.

Badane drobnoustroje	Aktywność antybiotyczna ekstraktu etanolowego z ziela glistnika	
	MBC (mg/ml)	JA
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 15062	2,5	400
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 1	2,0	500
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 2	2,5	400
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 3	2,5	400
<i>Staphylococcus aureus</i> 4	2,5	400
<i>Staphylococcus aureus</i> 51	10,0	100
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 9	5,0	200
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 10	5,0	200
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 53	2,5	400
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 190	2,0	500
<i>Streptococcus pyogenes</i> 15169	7,5	135
<i>Streptococcus pyogenes</i> gr. A 16027	1,0	1000
<i>Streptococcus pyogenes</i> 16490	2,0	500
<i>Streptococcus agalactiae</i> 14869	5,0	200
<i>Streptococcus agalactiae</i> 15568	2,5	400
<i>Enterococcus faecalis</i> S1	7,5	135
<i>Streptococcus faecium</i> 34B/8	10,0	100
<i>Moraxella catarrhalis</i> 16716	1,0	1000
<i>Moraxella catarrhalis</i> 16150	5,0	200

MRSA – szczep *Staphylococcus aureus* oporny na metycylinę

Tabela 6. Działanie ekstraktu etanolowego z ziela glistnika na bakterie Gram-ujemne wyizolowane z materiału klinicznego.

Badane drobnoustroje	Aktywność antybiotyczna ekstraktu etanolowego z ziela glistnika	
	MIC (mg/ml)	JA
<i>Escherichia coli</i> S1	7,5	135
<i>Enterobacter cloacae</i> 38214	12,5	80
<i>Enterobacter hafniae</i> 3/52	7,5	135
<i>Enterobacter aerogenes</i> 35B	10,0	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 231	10,0	100
<i>Citrobacter freundii</i> 3B	2,5	400
<i>Proteus mirabilis</i> 2050	5,0	200
<i>Proteus vulgaris</i> 425	5,0	200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8	7,5	135
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 10	7,5	135
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13	5,0	200

leczenia ran i oparzeń zakażonych drobnoustrojami chorobotwórczymi, w tym gronkowcami opornymi na metycylinę.

Wnioski

1. Najwyższą aktywnością antybiotyczną odznaczają się ekstrakty etanolowe z ziela glistnika, niższą – ekstrakty etanolowe z siewek, a najniższą – frakcje białkowe i niebiałkowe otrzymane z ekstraktów wodnych pozyskanych z tej rośliny.
2. Aktywność antybiotyczną ekstraktów i frakcji warunkują głównie alkaloidy i flawonoidy występujące w glistniku.

3. Wybrany ekstrakt etanolowy z ziela glistnika (ziele rozety liściowej jesiennej) wykazuje wysoką aktywność antybiotyczną i może znaleźć zastosowanie w praktyce medycznej do leczenia ran i oparzeń zakażonych drobnoustrojami, w tym gronkowcami opornymi na metycylinę.

Piśmiennictwo

1. Kędzia B, Hołderna-Kędzia E, Goździcka-Józefiak A i wsp. Przeciwdrobnoustrojowe działanie *Chelidonium majus* L. Post Fitoter 2013; (4):236-43.
2. Kędzia B, Łożykowska K, Gryszczyńska A. Skład chemiczny i zawartość substancji biologicznie aktywnych w *Chelidonium majus* L. Post Fitoter 2013; (3):174-81.
3. European Pharmacopoeia 6 Ed. *Chelidonium majus* monography. Council of Europe, Strasbourg 2008; 1861.

otrzymano/received: 10.04.2015
zaakceptowano/accepted: 24.04.2015

Adres/address:
*prof. dr hab. Bogdan Kędzia
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich
ul. Libelta 27, 61-707 Poznań
tel.: +48 (61) 665-95-50, fax: +48 (61) 665-95-51
e-mail: bogdan.kedzia@iwnirz.pl