

Analiza zawartości związków farmakologicznie czynnych w ziele seradeli siewnej (*Ornithopus sativus* Brot.)

Katedra Farmakognozji i Fitochemii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Kierownik Katedry: dr hab. n. farm. Ilona Kaczmarczyk-Sedlak

ANALYSIS OF PHARMACOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS CONTENT IN HERB OF SERADELLA (*ORNITHOPUS SATIVUS* BROT.)

SUMMARY

Ornithopus sativus Brot. (seradella or common bird's foot) is an annual forage crop belonging to Fabaceae family. Other plants belonging to this family are commonly used as medicinal plants or as a source of pharmacologically active compounds such as coumarins, saponins, phenolic acids, alkaloids and flavonoids (especially isoflavonoids).

The aim of the presented study was to identify pharmacologically active compounds in the herb of common bird's foot.

The grounded material (aerial parts of the plant) was extracted in various extrahents and then quantitative tests (for flavonoids, tannins and saponins) as well as 1D and 2D thin layer chromatography for flavonoids, phenolic acids, coumarins, trigonelline and arbutin were performed. In 1D and 2D TLC extracts were separated on Silica-gel plates 60 F254, visualized and then analyzed in UV light.

Obtained results indicated, that in analyzed herb, the tannins and flavonoids are present, while there was no sign of saponins. Among all detected substances, some flavonoids (quercetin, kaempferol, genistein, daidzein, glabridin, biochanin A, rhamnetin, luteolin, apigenin, formononetin and mirycetin), were found in seradella herb. Phenolic acids (caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid) and coumarins (umbelliferone) were also identified in analyzed material. There was no sign of arbutin or alkaloid trigonelline in tested sample.

KEYWORDS: *ORNITHOPUS SATIVUS* – *SERADELLA* – TLC – PHYTOCHEMISTRY – FLAVONOIDS

Wstęp

Opis botaniczny rośliny

Ornithopus sativus Brot. (seradela siewna, syn. francuska) to uprawna roślina pastewna należąca do rodziny Fabaceae (bobowate) (1). Jest rośliną rozgałęzioną o pokroju początkowo wyprostowanym, z czasem płozącą (2). Łodyga wznosi się na wysokość 30-90 cm (1). Pędy są smukłe, dobrze wykształcone, krótko owłosione, gęsto ulistnione. Seradela ma cienkie, wykopodobne, nieparzysto pierzastołożone, siedzące liście o długości

3-7 cm, liczące od 19 do 35 szeroko umiejscowionych, mniejszych listków o długości 4-13 mm i szerokości 3-6 mm. Są one koloru niebieskawozielonego (2, 3). Kwiaty są szypułkowate, baldachopodobne o długości 5-8 mm, typowego kształtu, koloru od różowego do białego, ułożone w grupy od 2 do 7 (2). Seradela wytwarza nasiona w skórzastych (łykowatych) strąkach, które mogą być podzielone na pojedyncze segmenty. Strąki są spłaszczone, proste albo nieznacznie skrzycone, długości 12-25 mm, wąskie między nasionami, zwężające się ku górze. Zawierają od 3 do 7 pojedynczych dojrzwających nasion. Strąki występują na wysokości do 70 cm. Seradela wykształca nasiona żółtojasnobrązowe, podłużnego kształtu, długości od 1,5 do 3 mm, w liczbie 350-450 000/kg. Odnacza się głębokim systemem korzeniowym, dzięki któremu zdolna jest do zachowywania wilgoci oraz składników odżywczych w glebie (4).

Historia i występowanie

Seradela występuje głównie na suchych, piaszczystych glebach Portugalii, zachodniej i centralnej części Europy, w Australii i południowo-wschodniej części USA. Jest powszechnie uprawianą rośliną paszową na Półwyspie Iberyjskim i niektórych obszarach północnej części Afryki. W niektórych rejonach używana jest jako uprawna roślina paszowa (zielona i sucha pasza) albo jako zielony nawóz. Często rośnie w posianym zbożu i stosowana jest w płodozmianach w celu wzbogacenia gleby w azot.

Historia uprawy seradeli sięga XVIII wieku. Początkowo uprawiana była w Portugalii, skąd w XIX wieku rozprzestrzeniła się na Europę Zachodnią i Środkową. Ostatnio powierzchnie upraw w niektórych częściach Europy uległy zmniejszeniu. Intensywny program upraw został ustanowiony w Australii w celu przeprowadzania krzyżówek (hybrydyzacji), które zostały zastosowane, aby zwiększyć postęp hodowli (5). Hodowcy upraw we Francji wprowadzili kilka odmian, które są szeroko stosowane i używane głównie przez Australijczyków (6). Zdarza się, że na terenach uprawnych roślina ta dziczeje (2).

Cel pracy

Wiele roślin z rodziny *Fabaceae*, ze względu na bogactwo metabolitów wtórnych, wykazujących działanie farmakologiczne, jest używanych w medycynie konwencjonalnej oraz ludowej. Spośród substancji aktywnych, występujących w surowcach należących do tej rodziny, można wyróżnić: śluzy, alkaloidy, kumaryny, saponiny steroidowe i triterpenowe oraz w dużej ilości flawonoidy. Związki biologicznie aktywne występują w różnych częściach roślin z rodziny bobowatych. Można je znaleźć zarówno w kwiatach (*Trifolii flos*), korzeniach (*Glycyrrhizae radix*), nasionach (*Glycine semen*, *Cytisi semen*), jak również ziele (*Meliloti herba*, *Trifolii herba*, *Genistae herba*).

Seradela siewna (*Ornithopus sativus*), należąca do rodziny *Fabaceae*, jest rośliną uprawną o zastosowaniu paszowym, dlatego można przypuszczać, że nie zawiera ona związków szkodliwych lub trujących dla organizmów zwierzęcych. Ze względu na fakt, że wiele roślin – przedstawicieli rodziny bobowatych jest stosowanych w lecznictwie, można sądzić, że seradela również może zawierać metabolity wtórne o znaczeniu farmakologicznym.

Celem niniejszej pracy było opracowanie i zoptymalizowanie procesów izolacji substancji aktywnych z ziele *Ornithopus sativus*, ze szczególnym uwzględnieniem związków flawonoidowych, zoptymalizowanie warunków rozdzielania metodą TLC uzyskanych związków oraz wstępna ich identyfikacja.

Materiał i metody

Materiał roślinny

Do badań użyto ziele seradeli siewnej (*Ornithopus sativus*). Nasiona rośliny zakupione zostały w firmie Małopolska Hodowla Roślin HBP sp. z o.o., a następnie wysiane na terenie Ogrodu Botanicznego w Mikołowie. Wysiewu nasion dokonano z końcem kwietnia 2012 roku, a zbioru ziele w sierpniu tego samego roku. Zebrane ziele wysuszono w zaciemnionym, przewiewnym pomieszczeniu. Wysuszony materiał roślinny przechowywano w ciemnym miejscu w papierowych opakowaniach.

Do badań ziele wstępnie pocięto, a następnie drobno zmielono i przechowywano w ciemnych, szklanych zamykanych naczyniach.

Reakcje jakościowe

W celu zidentyfikowania wybranych grup związków farmakologicznie aktywnych w badanym materiale wykonano reakcje charakterystyczne.

Obecność flawonoidów została określona za pomocą reakcji:

- Shinody: do 1 ml ekstraktu metanolowego (1 mg/ml) dodano opiółków cynku i niewielką objętość stężonego kwasu solnego; pozytywny wynik to zmiana barwy roztworu charakterystyczna dla danej grupy flawonoidów: pomarańczowe zabarwienie roztworu świadczy o obecności flawonów, malinowoczerwone – flawonoli, a fioletowoczerwone – flawononów; brak zabarwienia jest charakterystyczny dla chalkonów i auronów,
- reakcji z kwasem borowym: 2 ml ekstraktu metanolowego 1 mg/ml odparowano do sucha w porcelanowej parownicy, następnie do parownicy dodawano kwasu bornego (3 ml) o stężeniu 3% oraz kwasu szczawiowego (roztwór 10%) i kolejny raz poddawano całkowitemu odparowaniu; suchą pozostałość zawieszono w 10 ml eteru dietylowego i obserwowano pod lampą UV – fluorescencja w ultrafiolecie świadczy o obecności związków flawonoidowych.

Saponiny identyfikowano za pomocą próby pienienia: odważono 0,5 g ziele seradeli siewnej i przeniesiono do kolby o pojemności 25 ml, następnie dodano 10 ml 1% wodnego roztworu taniny w celu strącenia substancji białkowych i przesączono przez sączek do próbówki, której zawartość wytrząsano przez 2 minuty – utrzymywanie się piany na powierzchni roztworu przez 60 sekund świadczy o obecności saponin w surowcu.

W celu zbadania obecności garbników wykorzystano wyciąg przygotowany w 50% metanolu (0,05 g/ml) i wykonano:

- próbę osadową: do 1 ml wyciągu metanolowego dodawano stopniowo 0,5% wodny roztwór żelatyny – obecność osadu jest wynikiem pozytywnym,
- reakcję z chlorkiem żelaza: do 1 ml wyciągu dodano kilka kropli 5% $AlCl_3$; granatowe zabarwienie świadczy o obecności garbników hydrolizujących,
- reakcję z odczynnikiem wanilinowym: do 1 ml wyciągu dodano 0,25 ml roztworu waniliny w kwasie solnym. W przypadku obecności garbników skondensowanych wyciąg zabarwia się na czerwono (7).

Ekstrakcja związków farmakologicznie aktywnych

W celu wyizolowania aglikonów flawonoidów, do 2 g zmielonego ziele seradeli siewnej dodano 2 ml 2M kwasu solnego i 10 ml acetonitrylu. Całość wytrząsano 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie płyn przesączono przez sączek karbowany i całkowicie odparowano. Suchą pozostałość rozpuszczono

w 10 ml metanolu 80% i ponownie odparowywano do objętości 2 ml (8).

Dodatkowo dokonano modyfikacji hydrolizy kwasowej glikozydów flawonoidowych:

- do 2 g zmielonego ziela seradeli siewnej dodano 5 ml acetonitrylu oraz 2 ml 2 M kwasu solnego. Po dwugodzinnym wytrząsaniu i przesączeniu przez sączek karbowany ekstrakt odparowano do suchej pozostałości na szkiełku zegarkowym. Następnie dodano 5 ml metanolu 80% i zagęszczono do objętości 2 ml,
- do 2 g zmielonego ziela seradeli siewnej dodano 10 ml acetonitrylu oraz 2 ml 2 M kwasu solnego. Całość wytrząsano przez 2 godz. i przesączono przez sączek karbowany. Ekstrakt odparowano do suchej masy na szkiełku zegarkowym. Następnie dodano 5 ml metanolu 80% i zagęszczono do objętości 1 ml,
- do 4 g zmielonego ziela seradeli siewnej dodano 4 ml 2 M kwasu solnego oraz 20 ml acetonitrylu. Po dwugodzinnym wytrząsaniu wyciąg przesączono przez sączek karbowany na szkiełko zegarkowe i odparowywano na łaźni wodnej do suchej pozostałości. Następnie dodano 5 ml metanolu 80%.

Glikozydy flawonoidowe izolowano z surowca zgodnie z opisem zamieszczonym w Farmakopei Polskiej VI (9). Dokonano również ekstrakcji pozwalających na identyfikację arbutyny, trygoneliny i związków kumarynowych, zgodnie z procedurami opisanymi w piśmiennictwie (7, 10, 11).

Chromatografia cienkowarstwowa

Chromatografię cienkowarstwową wykonywano dwiema metodami – jedno- (1D TLC) i dwukierunkową (2D TLC).

W chromatografii jednokierunkowej zastosowano szereg układów rozwijających, wskazanych w publikacjach. Niektóre układy zmodyfikowano (tab. 1). W 2D TLC wykorzystano kombinacje faz ruchomych użytych w 1D TLC (tab. 2). Jako fazy stałej używano płytek pokrytych Silica Gel 60 F254 (Merck). Jako odczynnik wywołujący zastosowano Natural Products Reagent (Sigma).

Tab. 2. Wykaz zastosowanych układów rozwijających w 2D TLC

Kierunek 1	Kierunek 2
Dichlorometan:izopropanol (28,5:1,5 v/v)	Toluen:chloroform:aceton (40:25:35 v/v)
Dichlorometan:izopropanol (28,75:1,25 v/v)	Toluen:chloroform:aceton (40:25:35 v/v)
Dichlorometan:izopropanol (25:5 v/v)	Toluen:chloroform:aceton (40:25:35 v/v)
Dichlorometan (30 v)	Toluen:chloroform:aceton (40:25:35 v/v)
Dichlorometan:izopropanol (28,75:1,25 v/v)	Octan etylu:kwas octowy:kwas mrówkowy:woda (100:11:11:27 v/v)
Dichlorometan:izopropanol (28,75:1,25 v/v)	Chloroform:aceton:kwas mrówkowy (75:16,5:8,5 v/v)
Toluen:chloroform:aceton (40:25:35 v/v)	Octan etylu:kwas octowy:kwas mrówkowy:woda (100:11:11:27 v/v)
Toluen:chloroform:aceton (40:25:35 v/v)	Chloroform:aceton:kwas mrówkowy (75:16,5:8,5 v/v)
Toluen:chloroform:aceton (40:25:35 v/v)	Dichlorometan:izopropanol (28,75:1,25 v/v)

Tab. 1. Wykaz zastosowanych układów rozwijających w 1D TLC

Rozpuszczalniki	Proporcje	Źródło literaturowe
Dichlorometan:izopropanol	95:5 (v/v)	(16)
Dichlorometan:izopropanol	97,5:2,5 (v/v)	(16)
Dichlorometan:izopropanol	90:10 (v/v)	(16)
Toluen:chloroform:aceton	40:25:35 (v/v)	(17)
Octan etylu:kwas octowy:kwas mrówkowy:woda	100:11:11:27 (v/v)	(9)
Chloroform:aceton:kwas mrówkowy	75:16,5:8,5 (v/v)	(18)
Toluen:octan etylu:kwas octowy	14:6:1 (v/v)	(11)
N-propanol:metanol:woda	4:1:4 (v/v)	(10)
Octan etylu:metanol:woda	100:17:13 (v/v)	(7)

Wyniki i dyskusja

Seradela siewna (*Ornithopus sativus*) jest rośliną powszechnie występującą w Europie, Australii oraz USA. Gatunek ten jest znany przede wszystkim jako roślina użytkowa i pastewna, lecz słabo zbadany pod kątem zawartości związków farmakologicznie aktywnych. Do tej pory w badaniach nad seradelą siewną skupiono się przede wszystkim na analizie zawartości związków steroidowych, takich jak brassinosteroidy (2). Seradela siewna należy do rodziny *Fabaceae*, do której zalicza się rośliny powszechnie stosowane w lecznictwie (m.in. soja, nostryk czy lukrecja). Surowce lecznicze pozyskiwane z roślin należących do tej rodziny bogate są w związki farmakologicznie aktywne, takie jak kumaryny i kwasy fenolowe, saponiny oraz wiele innych substancji stosowanych w medycynie. Rośliny lecznicze z rodziny *Fabaceae* zawierają również wiele związków flawonoidowych. Dlatego też celem pracy była identyfikacja związków farmakologicznie aktywnych w ziele *Ornithopus sativus*.

Aby zidentyfikować grupy tych związków w badanym materiale roślinnym, wykonano reakcje charakterystyczne, wskazujące na obecność lub brak badanych substancji. Lukrecja gładka (*Glycyrrhiza glabra*), roślina należąca do rodziny bobowatych, jest źródłem surowca leczniczego o zastosowaniu wykrztuśnym i ochronnym na śluzówkę żołądka. Swoje właściwości lecznicze zawdzięcza m.in. obecności saponin triterpenowych (12). Ze względu na fakt, że u niektórych przedstawicieli rodziny *Fabaceae* są obecne saponiny, postanowiono sprawdzić, czy seradela siewna, również należąca do tej rodziny, zawiera tego rodzaju związki. W tym celu wykonano próbę pienienia. Negatywny wynik tej próby, czyli brak utrzymującej się przez minutę piany na powierzchni wyciągu po 2-minutowym wytrząsaniu sugeruje, że w surowcu saponiny nie są obecne.

Na podstawie przeprowadzonych reakcji charakterystycznych stwierdzono obecność garbników w ziele *Ornithopus sativus*. Według danych piśmiennictwa, skondensowane garbniki zostały wykryte w wielu roślinach, w tym w roślinach bobowatych (13). Obecność garbników skondensowanych w roślinach bobowatych tłumaczy ich wykorzystanie jako pasz w rolnictwie, gdyż zapobiegają u przeżuwaczy wystąpieniu niestrawności i chronią białka pokarmowe przed drobnoustrojami. Izolowano je z *Trifolium repens* czy *Trifolium arvense*. Badania nad seradelą siewną przeprowadzone w niniejszej pracy dowiodły, że ziele tej rośliny zawiera związki o charakterze garbników pirogalolowych i pirokatechinowych.

Garbniki pirokatechinowe należą do grupy garbników skondensowanych, natomiast pirogalolowe są

stosunkowo nietrwałe i łatwo hydrolizują, uwalniając kwas galusowy lub elagowy (14). Biologiczne i farmakologiczne działanie garbników uzależnione jest ściśle od ich struktury. Garbniki hydrolizujące składają się z kwasu galusowego lub elagowego oraz cząsteczki cukru. W organizmie ludzkim mogą zmniejszać dostępność żelaza i prowadzić do anemii. Garbniki skondensowane nie wchodzi w interakcje z żelazem i nadają się do konsumpcji i lecznictwa. Izolowano je z takich roślin, jak sosna zwyczajna (*Pinus silvestris*), jabłoń (*Malus* sp.), z czerwonego wina i cynamonu (*Cinnamomum* sp.). Garbniki skondensowane według badań wykazują szereg właściwości leczniczych. U pacjentów z defektem wydzielania mucyny przez komórki kubkowe zmniejszają stan zapalny w przewodzie pokarmowym podczas toczącego się wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, tworząc na powierzchni przewodu pokarmowego warstwę ochronną. Działają przeciwbakteryjnie wobec *Staphylococcus aureus*, a także wobec bakterii z gatunków *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas aeruginosa* (pałeczka ropy błękitnej). Dzięki tym właściwościom pomagają utrzymać prawidłową florę bakteryjną przewodu pokarmowego (15).

Flawonoidy to powszechnie występujące związki w roślinach z rodziny *Fabaceae*. Ich obecności w ziele *O. sativus* dowiodły przeprowadzone reakcje jakościowe. Na podstawie koloru uzyskanego w reakcji Shinody stwierdzono flawonoidy w ziele badanej rośliny.

Identyfikację związków aktywnych farmakologicznie, głównie flawonoidowych, w ziele seradeli siewnej przeprowadzano w oparciu o metodę cieczowej chromatografii cienkowarstwowej – TLC. Do analizy wykorzystano dwa typy tej metody (jedno- i dwukierunkową) oraz różne układy rozwijające w celu osiągnięcia jak najlepszej rozdzielczości chromatogramów. Hydroliza glikozydów flawonoidowych umożliwiła lepszy rozdział i dokładniejszą identyfikację związków zawartych w badanym materiale roślinnym. Próby jej optymalizacji, polegającej na zmianach co do ilości stosowanego kwasu solnego i acetonitrylu, nie powodowały polepszenia otrzymywanych chromatogramów. Pozytywne okazały się jednak zmiany w ilości dodawanego końcowo metanolu i maksymalne zagęszczanie otrzymywanych wyciągów.

Faza ruchoma – octan etylu:kwas octowy:kwas mrówkowy:woda 100:11:11:27, opisana w Farmakopei Polskiej VI (9), pozwoliła na uzyskanie bardzo dobrego rozdziału kwasów fenolowych (ferulowego), rutozydu, kemferolu, kwercetyny i apigeniny, jednak była nieodpowiednia do rozdziału izoflawonów, gdyż jak zaobserwowano, wzorce tych związków migrowały

z czołem rozpuszczalnika. Taka kombinacja rozpuszczalników umożliwiła również dokładną identyfikację kemferolu i apigeniny, które w innych układach wykazywały zbliżone wartości R_f i barwę żółtą. Układy rozwijające – dichlorometan:izopropanol 28,75:1,25 v/v, chloroform:aceton:kwas mrówkowy 75:16,5:8,5 v/v oraz toluen:chloroform:aceton 40:25:35 v/v (16-18) zastosowane zostały do rozdzielania aglikonów flawonoidowych. Pomocny w identyfikacji związków okazał się odczynnik wywołujący (Natural Products Reagent), który pogłębiał barwy związków na chromatogramach – barwy wywołanych związków różniły się przed wizualizacją i po wizualizacji tym odczynnikiem. Dzięki zastosowaniu metody jednokierunkowej cieczonej chromatografii cienkowarstwowej możliwe było zidentyfikowanie kwercetyny, kemferolu, glabrydyny, genisteiny, apigeniny, kwasu chlorogenowego oraz umbeliferonu w ziele *Ornithopus sativus*.

W przypadku dwukierunkowej chromatografii TLC wykorzystano wybrane układy zastosowane w metodzie jednokierunkowej. Dzięki różnym kombinacjom układów stosowanych w chromatografii dwukierunkowej można było zoptymalizować proces rozdzielania związków w ekstraktach, a uzyskane chromatogramy cechowały się dużo lepszą rozdzielczością. Wykorzystanie tej modyfikacji metody TLC pozwoliło wykryć i zidentyfikować większą ilość związków aktywnych.

Najlepszy rozdział zidentyfikowanych związków uzyskano zestawiając ze sobą układy toluen:chloroform:aceton (40:25:35 v/v) (kierunek 1) i dichlorometan:izopropanol w modyfikacji (28,75:1,25 v/v) (kierunek 2) oraz toluen:chloroform:aceton (40:25:35 v/v) (kierunek 1) i chloroform:aceton:kwas mrówkowy (75:16,5:8,5 v/v) (kierunek 2).

W układzie dichlorometan:izopropanol (28,75:1,25 v/v) – toluen:chloroform:aceton (40:25:35v/v) stwierdzono obecność daidzeiny, ramnetyny, kwasu kawowego, ferulowego oraz hesperydyny, które w chromatografii jednokierunkowej były niewykrywalne. Ponadto potwierdzono obecność związków zidentyfikowanych w metodzie jednokierunkowej. Natomiast odwrócenie kolejności tych układów umożliwiło dodatkowo zidentyfikowanie biochaniny A.

Analiza chromatograficzna pozwoliła na wykrycie w ziele seradeli siewnej związków flawonoidowych, takich jak kwercetyna, kemferol, glabrydyna, genisteina, apigenina, luteolina, formononetyna, mirycetyna, daidzeina, ramnetyna, hesperydyna i biochanina A oraz następujących kwasów fenolowych: kawowego, ferulowego oraz chlorogenowego. Zidentyfikowane w ziele *O. sativus* związki występują również w innych roślinach, które mają zastosowanie w medycynie.

Kemferol, który wykryto w ziele seradeli, powszechnie występuje w roślinach, wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwutleniające i ochronne na układ krążenia. Obecny jest m.in. w herbacie chińskiej (*Camellia sinensis*). Flawonoid ten występuje również u innych przedstawicieli rodziny *Fabaceae*, m.in. w traganku *Astragalus corniculatus* (19), różnych gatunkach fasoli z rodzaju *Vigna* (20) czy w bobie (*Vicia faba*) (21).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wykazały, że ziele seradeli zawiera przeciwutleniającą kwercetynę. Podobnie jak w przypadku kemferolu, związek ten w największych ilościach występuje w czarnej herbacie (*Camellia chinensis*). Identyfikowana również w roślinach z rodziny *Brassicaceae* (*Brassica oleracea* – rzepak), *Alliaceae* (*Allium sativum* – czosnek) i *Solanaceae* (*Capsicum annuum* – papryka zielona i czerwona). Podobnie jak kemferol, kwercetyna również występuje w roślinach należących do rodziny *Fabaceae*, takich jak fasola zwyczajna (*Phaseolus vulgaris*), groch zwyczajny (*Pisum sativum*) oraz soja zwyczajna (*Glycine max*) (22).

W ziele seradeli siewnej wykryto również mirycetynę oraz luteolinę. Luteolina wykrywana była wcześniej w zielonym i czerwonym chilli, brokułach i liściach cebuli. Zarówno mirycetyna, jak i luteolina wykazują działanie przeciwutleniające i obecne są u innych przedstawicieli rodziny *Fabaceae*. Mirycetyna znajduje się w wyce kosmatej (*Vicia villosa*), a luteolina w luncernie siewnej (*Medicago sativa*) (22, 23).

Przeprowadzenie chromatografii cienkowarstwowej jedno- i dwukierunkowej wyciągu z ziele seradeli pozwoliło na wykrycie wielu innych związków, takich jak apigenina, kwas chlorogenowy, kwas kawowy, kwas ferulowy oraz hesperydyna. Hesperydyna obecna jest powszechnie w pomarańczach i cytrynach. Często towarzyszy witaminie C. Pomaga w zmniejszaniu obrzęków nóg, powstających na skutek nadmiernego zatrzymywania wody w organizmie. Działa najskuteczniej, gdy podaje się ją wraz z witaminą C w zwiększonej kruchości naczyń krwionośnych. Hesperydyna wykazuje udokumentowane właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Zawarta w pomarańczy gorzkiej (*Citrus aurantium*) działa przeciwwirusowo, przeciwnowotworowo, przeciwalergicznie, przeciwutleniająco, immunomodulująco i regulująco na poziom estrogenów (24). Apigenina – związek o działaniu przeciwutleniającym i przeciwnowotworowym – występuje w owocach i warzywach, m.in. w kapuście pekińskiej, papryce, czosnku, selerze i guawie. Apigeninę, oprócz seradeli siewnej, wykryto także w innej roślinie z rodziny bobowatych – w grochu zwyczajnym (*Pisum sativum*) (22).

Kwasy fenolowe są powszechnie występującymi związkami w wielu roślinach i produktach spożywczych pochodzenia roślinnego. Obecnie zainteresowanie kwasami fenolowymi znacznie wzrasta z uwagi na ich lecznicze właściwości. Wszystkie trzy wykryte w seradeli kwasy fenolowe – chlorogenowy, ferulowy i kawowy – zaliczane są do kwasów hydroksycynamonowych. Kwas chlorogenowy zidentyfikowany w seradeli siewnej jest głównym związkiem czynnym zielonej kawy (*Coffea canephora*). Według najnowszych doniesień konsumpcja ziaren zielonej kawy powoduje hipotensyjne działanie u zwierząt i ludzi, a także pomaga w obniżaniu masy ciała i usprawnianiu metabolizmu glukozy (25).

W ekstrakcie z ziela seradeli wykazano również obecność kwasu ferulowego, za źródło którego powszechnie uważa się rośliny stosowane w chińskiej medycynie ludowej, takie jak *Angelica sinensis* (dziejgiel chiński) i *Cimicifuga heracleifolia* (pluskwica barszczolistna), należące do rodziny *Ranunculaceae*. Kwas ten wykazuje działanie przeciwutleniające, antybiotyczne, przeciwzakrzepowe oraz przeciwnowotworowe. Dodatkowo może być stosowany w zapobieganiu chorobom serca, w celu obniżania poziomu cholesterolu oraz jako czynnik zwiększający żywotność plemników. Powszechnie stosowany w przemyśle, jako substrat do produkcji waniliny i środków ochrony skóry (26). Kwas kawowy zapobiega utlenianiu lipidów o małej gęstości. Działa przeciwbakteryjnie w stosunku do bakterii *Bacillus*. Zidentyfikowany został między innymi w wiesiołku (*Oenothera*) (27).

Biorąc pod uwagę wykrycie w ziele seradeli siewnej związków farmakologicznie aktywnych o charakterze izoflawonów, należy zwrócić uwagę na ich farmakologiczne i użytkowe właściwości. Izoflawony stanowią podgrupę fitoestrogenów, naturalnych substancji pochodzenia roślinnego, mających strukturę chemiczną podobną do 17- β -estradiolu. Wywołany przez nie efekt ściśle zależy od poziomu endogennego estradiolu, ponieważ izoflawony i endogenne estradiol konkurują o miejsce przyłączenia się do receptora estrogenowego. W okresie postmenopauzalnym, gdy poziom endogennego estradiolu u kobiet jest niski, izoflawony dostarczane w postaci pożywienia lub suplementacji odgrywają znaczącą rolę w utrzymaniu homeostazy hormonalnej organizmu. Izoflawony powszechnie występują w rodzinie *Fabaceae*, a także w takich rodzinach, jak *Asteraceae*, *Iridaceae*, *Miristicaceae* i *Rosaceae*.

Wykryte w seradeli siewnej fitoestrogeny: genisteina i daidzeina wykazują szereg właściwości leczniczych i stosowane są w medycynie. *Nasiona soi*, które mają dużą zawartość izoflawonów, głównie genisteiny

i daidzeiny, wykazują dzięki nim właściwości przeciwutleniające oraz chroniące układ krążenia przed niekorzystnym wpływem lipoprotein o małej gęstości (LDL). Zmniejszają ryzyko chorób serca przez obniżenie poziomu całkowitego cholesterolu, a także lipoprotein LDL. Izoflawony łagodzą również objawy okresu menopauzalnego. Jak wykazano, genisteina hamuje działanie enzymów, takich jak kinaza tyrozynowa i topoizomeraza I, stymulujących proliferację komórek endotelialnych, hamując w ten sposób angiogenezę wywołaną przez czynniki nowotworowe. Ma to istotne znaczenie w zapobieganiu i leczeniu raka piersi (28). Naturalne izoflawony stanowią więc doskonałą alternatywę dla hormonalnej terapii zastępczej, mogącej okazać się negatywną w skutkach z powodu ryzyka wystąpienia raka piersi, raka słuźówki macicy lub chorób układu krążenia (29).

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania wykazały w ziele seradeli obecność formononetyny. Związek ten jest naturalnie występującym izoflawonem, który w niewielkich ilościach obecny jest w wielu produktach spożywczych. Największym jednak źródłem tego flawonoidu są rośliny zaliczane do rodziny *Fabaceae*. Jest głównym związkiem farmakologicznie aktywnym traganków: *Astragalus membranaceus* oraz *Astragalus mongolicus*. Został zidentyfikowany również w lukrecji gładkiej (*Glycyrrhiza glabra*) oraz lukrecji chińskiej (*Glycyrrhiza uralensis*). Ponadto niewielkie ilości formononetyny występują również w marchwi (*Daucus carota*) z rodziny *Apiaceae*, sałacie lodowej z rodziny *Asteraceae*, kalafiorze z rodziny *Brassicaceae* oraz w czerwonych ziemniakach (29).

Zidentyfikowana w ziele seradeli siewnej glabrydyna występuje przede wszystkim w korzeniach lukrecji gładkiej (*Glycyrrhiza glabra*) (30). Jednak wcześniejsze badania nad seradelą również donosiły na temat obecności glabrydyny w seradeli siewnej (2).

Biochaninę A, którą także zidentyfikowano w ziele seradeli siewnej, można znaleźć w rodzaju *Trifolium*, który jest bogaty w ten izoflawon. Związek ten obecny jest także w innych rodzinach niż *Fabaceae*. Powszechnie występuje w gatunkach roślin naczyniowych, w większości należących do rodziny roślin bobowatych oraz w wielu gatunkach traw i zbóż (*Graminae*) (31).

Zawartość związków farmakologicznie aktywnych w surowcach roślinnych jest związana z procesami metabolicznymi zachodzącymi w organizmie rośliny. Izoflawony, które wykazują działanie lecznicze u ludzi, u roślin z rodziny *Fabaceae* pełnią rolę przekąźnikową – są sygnałami chemicznymi wysyłanymi przez rośliny, celem utworzenia symbiozy z bakteriami brodawkowymi. Jak powszechnie wiadomo, rośliny bobowate

wykorzystywane są nie tylko w lecznictwie, ale także jako rośliny użytkowe wzbogacające glebę w azot. Wzbogacanie gleby w azot jest wynikiem wzajemnego współżycia roślin z rodziny *Fabaceae* z bakteriami brodawkowymi. Korzyści wynikające z tego procesu są obopólne, gdyż związany przez bakterie azot z atmosfery przetwarzany jest na amoniak oraz glutaminę i w takiej postaci dostarczany roślinom. Z kolei rośliny dostarczają bakteriom związków węgla niezbędnego do ich prawidłowego rozwoju. Pochodzące z symbiozy oraz samodzielnie związane z gleby związki azotu rośliny z rodzaju *Fabaceae* gromadzą na przykład w korzeniu albo liściach (32).

Ze względu na fakt, że rośliny te prowadzą symbiozę z bakteriami brodawkowymi, przypuszczano, że w badanym materiale roślinnym seradeli siewnej będą znajdować się związki uczestniczące w transdukcji sygnału procesu symbiozy. Procesy tworzenia brodawek i wiązania azotu atmosferycznego są wysoce swoiste dla danego gatunku rośliny, a bakterie wiążące azot zawierają ograniczoną liczbę gatunków żywicielskich. Przykład stanowi bakteria *Rhizobium leguminosarum*, oddziałująca z wykami lub grochem, czy *Bradyrhizobium japonicum*, wchodząca w symbiozę z systemem korzeniowym soi (33). Każdy rodzaj bakterii ma swoiste aktywatory chemiczne pobudzające do tworzenia nowych brodawek korzeniowych, dzięki czemu możliwe jest odróżnienie gospodarza od innych roślin bobowatych (34). U soi izoflawony, takie jak genisteina i daidzeina, stanowią najsilniejsze aktywatory czynników transkrypcyjnych genów *nod*. Seradela, podobnie jak soja, wchodzi w symbiozę z bakteriami *Bradyrhizobium japonicum* (35). Ze względu na fakt, że genisteina i daidzeina są czynnikami sygnalizującymi rozpoczęcie procesu symbiozy w soi, powinny być obecne również w seradeli. Badania wykonane w niniejszej pracy potwierdziły obecność tych związków. W badanej seradeli siewnej występują zarówno hesperydyna, apigenina i luteolina, jak również genisteina i daidzeina, które odgrywają znaczącą rolę w regulacji sygnałów pomiędzy bakteriami a ich swoistym gospodarzem (34, 36).

U niektórych gatunków z rodziny *Fabaceae* występują związki o charakterze kumaryn – w nostrzyku lub lucernie (37), względnie alkaloidów, takich jak trygonelina, obecnych m.in. w kozieradce pospolitej (*Trigonella foenum-graecum*) oraz soi zwyczajnej (*Glycine max*) (10, 38). Dlatego oprócz analizy zawartości związków flawonoidowych, metodę TLC wykorzystano do wykrywania kumaryn i trygoneliny w badanym materiale roślinnym. Dzięki wykorzystaniu układu toluen:octan etylu:kwas octowy (14:6:1 v/v) (11) można było stwierdzić obecność związków

o charakterze kumaryn, takich jak umbeliferon w ziele seradeli siewnej. Kumaryny, oprócz rodziny *Fabaceae*, powszechnie występują w takich rodzinach jak *Asteraceae*, *Apiaceae* i *Rutaceae*. Stanowią dużą grupę wtórnych metabolitów. Wykazano, że niektóre kumaryny, a wśród nich wykryty w seradeli siewnej umbeliferon, wykazują właściwości allelopatyczne. Allelopatyczne interakcje pomiędzy roślinami a innymi organizmami mogą być alternatywą dostosowania syntetycznych herbicydów i pestycydów (37). Układ przeznaczony do rozdziału trygoneliny – n-propanol:metanol:woda (4:1:4 v/v) (10) okazał się odpowiedni do wykrycia tego alkaloidu, gdyż wzorzec nie migrował wraz z czołem rozpuszczalnika, jednak nie zaobserwowano obecności tego związku w ziele *O. sativus*.

W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy zastosowano również układ rozwijający, umożliwiający wykrycie w surowcu glikozydów fenolowych, takich jak arbutyna – octan etylu:metanol:woda (100:17:13 v/v) (7). Związek ten występuje u przedstawicieli rodziny *Fabaceae*, takich jak nostrzyk żółty (*Melilotus officinalis*) czy esparceta siewna (*Onobrychis viciifolia*) (12, 39), jednak nie stwierdzono jego obecności w ziele seradeli.

Podsumowanie

Izolacja i identyfikacja za pomocą chromatografii dużej liczby izoflawonów w ziele seradeli siewnej wymaga dalszych badań i może w przyszłości zaowocować zastosowaniem tej rośliny w lecznictwie.

Piśmiennictwo

1. Rutkowski L. Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2008; 257.
2. Bajaj YPS. Medicinal and aromatic plants. XI *Ornithopus sativus* (seradela): *in vitro* culture, phytochemical studies, and biotransformations. Springer-Verlang, Berlin Heidelberg 1999; 311.
3. Revell C. French seradella – soft seeded 2007, http://www.pasturepicker.com.au/Html/French_serradella-soft_seeded.htm.
4. Craig A. Research scientist, seradella – a pasture legume for deep acid sands. Fact Sheet 2005; 137(33):1-4.
5. Hanelt P. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Mansfield's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops. Springer-Verlang, Berlin Heidelberg 2001; 819-21.
6. George RAT. Agricultural seed production. CABI 2011; 10:113-4.
7. Strzelecka H, Kamińska J, Kowalski J i wsp. Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych. Warszawa 1982; 146-7, 280.
8. Kim SH, Jung WS, Ahn JK i wsp. Analysis of isoflavone concentration in soybean (*Glycine max* L.) seeds between the cropping year and storage for 3 years. E Food Res Tech 2005; 220:207-14.
9. Farmakopea Polska. Wyd. VI. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa 2002.
10. Chopra S, Ahmad FJ, Khar RK i wsp. Validated high-performance thin-layer chromatography method for determination of trigonelline in herbal extract and pharmaceutical dosage form. Anal Chim Acta 2006; 577:46-51.
11. Wichtl M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientific basis. Med Pharm Sci Pub 2000.
12. Marais JPJ, Mueller-Harvey I,

- Brandt E i wsp. Polyphenols condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* Sainfoin. *J Agric Food Chem* 2000; 48:3440-7. **13.** Jones WT, Broadhursts RB, Lyttleton JW. The condensed tannins of pasture legume species. *Phytochem* 1976; 15:1407-9. **14.** Khanbabae K, van Ree T. Tannins: Classification and definition. *Nat Prod Res* 2001; 18:641-9. **15.** Clinton C. Plant tannins: a novel approach to the treatment of ulcerative colitis. *Nat Med J* 2009; 1:1-3. **16.** Lapcik O, Hill M, Cerny I i wsp. Immunoanalysis of isoflavonoids in *Pisum sativum* and *Vigna radiate*. *Plant Sci* 1999; 148:111-9. **17.** Kotkar HM, Mendki PS, Sadan SV i wsp. Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. *Pest Manag Sci* 2001; 58:33-7. **18.** Wagner H, Blatt S. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Springer-Verlag, Brooklyn, New York. **19.** Krasteva I, Nicolova I, Danchev N i wsp. Phytochemical analysis of ethyl acetate extract from *Astragalus corniculatus* Bieb. and brain antihypoxic activity. *Acta Pharm* 2004; 5:151-6. **20.** Onyilagha J, Islam S, Ntamatungiro S. Comparative phytochemistry of eleven species of *Vigna Fabaceae*. *Biochem System Ecol* 2009; 37:16-9. **21.** Baginsky C, Pena-Neira A, Caceres A i wsp. Phenolic compound composition in immature seeds of fava bean *Vicia faba* L. varieties cultivated in Chile. *J Food Compos Anal* 2013; 31:1-6. **22.** Miesan KH, Mohamed S. Flavonoid myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin content of edible tropical plants. *J Agric Food Chem* 2001; 49:3106-12. **23.** Burghardt F. Uptake of flavonoids from *Vicia villosa Fabaceae* by the lycaenid butterfly, *Polyommatus icarus Lepidoptera: Lycaenidae*. *Biochem Syst Ecol* 1997; 6:527-36. **24.** Garg A, Garg S, Zaneveld LJD i wsp. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res* 2001; 15:655-69. **25.** Farah A, Monteiro M, Donangelo C i wsp. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *J Nutr* 2008; 12(138):2309-15. **26.** Kwok K, Shiya O. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J Sci F Agric* 2004; 11(84):1261-9. **27.** Gawlik-Idzik U. Fenolokwasy jako bioaktywne dodatki do żywności. *ŻNTJ* 2004; 4:29-40. **28.** Vincent A, Fitzpatrick LA. Soy isoflavones: Are they useful in menopause? *Mayo Clin Proc* 2000; 11:1174-84. **29.** Kaczmarczyk-Sedlak I, Wojnar W, Zych M i wsp. Effect of formononetin on mechanical properties and chemical composition of bones in rats with ovariectomy induced osteoporosis. *Evid Based Compl Alt Med* 2013; Article ID 457052:1-10. **30.** Tamir S, Eizenberg M, Somjen D. Estrogenic and antiproliferative properties of glabridin from licorice in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60:5704-9. **31.** Zgórk G. Studies on phytoestrogenic and nonphytoestrogenic compounds in *Trifolium incarnatum* L. and other clover species using pressurized liquid extraction and high performance column liquid chromatography with photodiode-array and fluorescence detection. *J AOAC Int* 2011; 94:22-31. **32.** Pietrzak S. Kwantyfikacja azotu wiązanego symbiotycznie przez rośliny motylkowate. *Wod Środ Obsz Wiej* 2011; 11:197-207. **33.** Stougaard J. Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Phys* 2000; 124:531-40. **34.** Hirsch AM, Lum MR, Downie AJ. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special. *Plant Phys* 2001; 127:1484-92. **35.** Kozłowski S, Swędrzyński A, Zielewicz W. Rośliny motylkowate w środowisku przyrodniczym. *Wod Środ Obsz Wiej* 2011; 11:161-81. **36.** Zechner S, Schrober G, Wenzel M i wsp. Expression of the *Brachypodium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated tsx box promoter. *Mol Plant Microb Interact* 2008; 8:1087-93. **37.** Razaavi Mehdi S. Plant coumarins as allelopathic agents. *Int J Biol Chem* 2011; 1:86-90. **38.** Cho Y, Lightfoot DAJ, Wood A. Trigonelline concentrations in salt stressed leaves of cultivated *Glycine max*. *Phytochem* 1999; 52:1235-8. **39.** Bubenchikova VN, Drozdova IL. HPLC analysis of phenolic compounds in yellow sweet clover. *Pharm Chem J* 2004; 38:195-6.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 12.08.2015

zaakceptowano/accepted: 23.09.2015

Adres/address:

*mgr Weronika Wojnar

Katedra i Zakład Farmakognozji i Fitochemii

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny

Laboratoryjnej w Sosnowcu

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

tel. +48 (32) 364-15-23

e-mail: wwojnar@sum.edu.pl