

Natalia Kłeczek

**Analiza fitochemiczna wybranych roślin z plemienia Inuleae –
izolacja wtórnych metabolitów o potencjalnym działaniu
przeciwbakteryjnym, przeciwzapalnym i cytotoksycznym oraz
wstępna ocena ich aktywności.**

STRESZCZENIE

W ostatnim czasie obserwuje się ponowny zwrot ku izolacji i badaniu wtórnych metabolitów roślin, grzybów i organizmów wodnych, celem pozyskania nowych związków o określonej aktywności biologicznej. Okazuje się, że surowce naturalne to niemal nieograniczone źródło substancji o zastosowaniu medycznym. Opierając się na danych etnobotanicznych zakres poszukiwań związków o potencjale leczniczym można zawęzić do roślin używanych w medycynie ludowej. Roślinami o renomowanej wartości medycznej są m.in. gatunki należące do plemienia Inuleae. Na temat metabolitów wtórnych *I. helenium* L., *I. britannica* L., *B. balsamifera* (L.) DC. powstało wiele prac wskazujących, że rośliny te syntetyzują związki posiadające m.in. działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe. Jednak o wielu gatunkach plemienia Inuleae wciąż niewiele wiadomo.

Przedmiotem analiz fitochemicznych zaprezentowanych w niniejszej pracy były dwa gatunki roślin należących do tego plemienia: *Xerolekia speciosissima* (L.) Anderb. oraz *Carpesium divaricatum* Sieb.& Zucc. Gatunek pierwszy to endemit alpejski, dotąd nie zbadany pod względem składu wtórnych metabolitów. *C. divaricatum* to roślina stosowana na terenie Chin, Korei i Japonii jako remedium w chorobach zapalnych, przeziębieniu, gorączce i innych dolegliwościach. W niektórych rejonach Azji spożywana jest także jako warzywo. Terpenoidy wytwarzane przez *C. divaricatum* są przedmiotem licznych doniesień literaturowych, natomiast niewiele

wiadomo o innych metabolitach akumulowanych w roślinie.

Celem prac analitycznych była identyfikacja wcześniej nieznanymi metabolitów obu gatunków oraz izolacja związków o potencjalnej aktywności biologicznej do dalszych badań. Porównanie profilu chemicznego gatunków blisko spokrewnionych: *T. speciosa*, *B. salicifolium* L. oraz *X. speciosissima* miało na celu uzupełnienie zmian dokonanych ostatnio w klasyfikacji taksonomicznej w obrębie plemienia Inuleae o dane chemofenetyczne.

Pierwszy etap analiz fitochemicznych obejmował rozdział uzyskanych ekstraktów chloroformowych i wodno-metanolowych metodami chromatograficznymi: CC, TLC, pTLC i RP-HPLC-UV oraz identyfikację składników ekstraktów przy pomocy RP-HPLC-DAD lub UHPLC-DAD-MSⁿ. Dla związków wyizolowanych w ilościach wystarczających do badań spektralnych wykonano widma protonowego rezonansu magnetycznego (¹H NMR). Dla metabolitów nieopisanych wcześniej w literaturze wykonano komplet badań spektralnych (1D i 2D NMR, HRESIMS) w celu ustalenia ich struktury chemicznej.

W toku prac izolacyjnych z wyciągu chloroformowego z korzeni *X. speciosissima* pozyskano pięć monoterpenuoidowych pochodnych tymolu, w tym trzy znane: 8-hydroksy-9,10-diizobutyryloksytymol, izomaślan 7,10-diizobutyryloksy-8,9-epoksytymolu, izomaślan 10-izobutyryloksy-7-izowaleryloksy-8,9-epoksytymolu oraz dwa związki nowe: 8-hydroksy-9-izobutyryloksy-10-izowaleryloksytymol i 8-hydroksy-9,10-diizowaleryloksytymol. Z wyciągu chloroformowego z części nadziemnych tej rośliny wyizolowano laktony seskwiterpenowe (2,3-dihydroaromatycynę, 2-deoksy-4-*epi*-pulchellinę, santamarynę i rejnozynę) i jeden apokarotenoid – loliolid. Wyciągi wodno-metanolowe z korzeni i części nadziemnych *X. speciosissima*, analizowane metodą UHPLC-DAD-MSⁿ, ujawniły obecność kwasów kawoilochinowych i kawoilohexsarowych oraz ich estrów z krótkołańcuchowymi kwasami organicznymi. W ekstrakcie z części nadziemnych zidentyfikowano dodatkowo glikozydowe pochodne kemferolu i kwercetyny. Kwiatostany *X. speciosissima* były źródłem kwasu kawowego i jego pochodnych

(głównie kwasu 5-*O*-kawoilochinowego i kwasu 1,5-di-*O*-kawoilochinowego), flawonoidów (glukozydy kwercetyny, kemferolu, 6-hydroksykwercetyny, i 6-hydroksykemferolu), neolignanów oraz kwasu protokatechowego.

Analiza porównawcza metabolitów polifenolowych produkowanych przez trzy blisko spokrewnione gatunki: *T. speciosa*, *B. salicifolium* oraz *X. speciosissima* wykazała, że akumulacja kwasów kawoilohexanowych jest charakterystyczna dla *X. speciosissima*. Estry kwasów kawoilochinowych z kwasami izomasłowym i metylomasłowym są obecne jedynie w *B. salicifolium* i *X. speciosissima*, natomiast *T. speciosa* była jedynym gatunkiem zawierającym kwas 3,5-di-*O*-kawoilochinowy. Wyniki tej analizy, w połączeniu z wynikami prac izolacyjnych, potwierdziły słuszność ostatnio przyjętej klasyfikacji taksonomicznej z wyodrębnieniem *Xerolekia* jako nowego monotypowego rodzaju.

Z wyciągu chloroformowego z części nadziemnych *C. divaricatum* wyodrębniono pięć znanych laktonów seskwiterpenowych typu germakranu (dwa z nich zostały opisane jako nowe w 2018 r.) oraz jedną oksylipinę - kwas *trans*-12-okso-fitodienowy (12-OPDA). W wyciągu wodno-metanolowym, analizowanym metodą UHPLC-DAD-MSⁿ, zidentyfikowano kwasy kawoilohexanowe i kawoilochinowe oraz ich estry. Skład tego wyciągu wskazuje na bliską relację systematyczną *Xerolekia* i *Carpesium*.

Kolejnym etapem pracy było przeprowadzenie testów przesiewowych w kierunku aktywności biologicznej wyizolowanych związków. Na podstawie wydajności izolacyjnej, podobieństwa strukturalnego do związków o potwierdzonej aktywności biologicznej oraz danych literaturowych, do badań wyłoniono siedem związków: trzy monoterprenoidowe pochodne tymolu, trzy laktony seskwiterpenowe oraz 12-OPDA.

W teście krążkowo-dyfuzyjnym Kirby-Bauer zbadano właściwości przeciwbakteryjne dwóch pochodnych tymolu wyizolowanych z *X. speciosissima*: 8-hydroksy-9-izobutyryloksy-10-izowaleryloksytymolu oraz izomaślanu 10-izobutyryloksy-7-izowaleryloksy-8,9-epoksytyymolu wobec *Staphylococcus aureus*. Pomimo, że dane literaturowe dotyczące 8-hydroksy-9,10-diizobutyryloksytymolu

wskazują na jego wysoką aktywność, badane przez nas związki te nie wykazały działania przeciwbakteryjnego.

Działanie przeciwzapalne zbadano dla 12-OPDA, kardiwarolidu G, $4\beta,8\alpha$ -dihydroksy- 5β -angeloiloksy- 9β -(2-metylbutyryloksy)-3-okso-germakran- $6\alpha,12$ -olidu i izomaślanu 7,10-diizobutyryloksy-8,9-epoksytymolu. W zakresie badanych stężeń (0,5 – 2,5 μ), żaden z wymienionych związków nie wykazywał działania cytotoksycznego w stosunku do izolowanych neutrofilii. Badane metabolity roślinne w istotny sposób statystycznie obniżały uwalnianie ROS oraz cytokin prozapalnych przez ludzkie neutrofile stymulowane LPS bądź f-MLP.

Wykonano dwa testy aktywności cytotoksycznej względem linii komórek nowotworowych. Test MTT wykonano na dwóch liniach kostniakomięsaka (osteosarkomy): U-2 OS (linia dzika) oraz SAOS-2 (z delecją genu *p53*). W teście LDH wykorzystano trzy panele komórek nowotworowych oraz linie komórek niestransformowanych nowotworowo. Test MTT wskazywał na nieco silniejsze działanie kardiwarolidu G niż $4\beta,8\alpha$ -dihydroksy- 5β -angeloiloksy- 9β -(2-metylbutyryloksy)-3-okso-germakran- $6\alpha,12$ -olidu, po 24 i 48 h, na obie linie komórkowe. Zaobserwowano też, że zastosowana jako związek referencyjny dokсорubicyna działa silniej niż oba testowane związki. W teście LDH zbadano trzeci z wyizolowanych germakranolidów - $4\beta,8\alpha$ -dihydroksy- 5β -izobutyryloksy- 9β -(3-metylbutyryloksy)-3-okso-germakran- $6\alpha,12$ -olid, który wykazał umiarkowaną aktywność względem wszystkich badanych linii, włącznie z liniami komórek normalnych.

Analizy fitochemiczne *X. speciosissima* oraz *C. divaricatum* ujawniły obecność znanych metabolitów roślinnych oraz związków nieznanych dotąd z występowania w naturze. Szereg związków zostało zidentyfikowanych po raz pierwszy jako metabolity roślin należących do badanych taksonów. Większość metabolitów *X. speciosissima* posiada udokumentowaną w literaturze aktywność biologiczną, co sugeruje że roślina ta może posiadać właściwości lecznicze, a uzyskane wyniki wskazują na jej działanie przeciwzapalne. Z kolei rezultaty badań wykonanych dla związków pochodzących z *C. divaricatum*, częściowo wyjaśniają działanie przeciwzapalne tej rośliny oraz

potwierdzają umiarkowaną i nieselektywną aktywność cytotoksyczną testowanych germakranolidów.

Natalia Kłeczek

**Phytochemical analysis of selected plants of the Inuleae tribe:
Isolation of secondary metabolites of potential antibacterial,
anti-inflammatory and cytotoxic activities with preliminary
evaluation of their effects.**

SUMMARY

Recently, there has been a renewed interest in searching for secondary metabolites from plants, fungi and aquatic microorganisms, in order to obtain new compounds with specific biological activities. It turns out that natural resources are almost an unlimited source of compounds for medical use. Based on ethnobotanical data, the search for compounds with healing potential can be narrowed down to plants used in folk medicine. Species belonging to the tribe Inuleae are particularly reputable for their medical value. Numerous papers on composition of secondary metabolites from *I. helenium* L., *I. britannica* L., *B. balsamifera* (L.) DC have been published to date. They indicate the presence of the plant constituents that possess, among others, antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. On the other hand, there are many less studied species of the Inuleae and little is known about their chemical composition.

The subject of phytochemical analyzes presented in this study were two plant species belonging to the Inuleae tribe: *Xerolekia speciosissima* (L.) Anderb. and *Carpesium divaricatum* Sieb. & Zucc. The former was an alpine endemic of unknown chemical composition; the latter (*C. divaricatum*) was a medicinal plant used in China, Korea and Japan as a remedy for inflammation, colds, fever, and other ailments. In some areas of East Asia *C. divaricatum* is also consumed as a vegetable. The

terpenoids produced by *C. divaricatum* are the subject of numerous literature reports, while little is known about other metabolites accumulated in this plant.

The main purpose of the analytical work was to identify previously unknown metabolites of both species and to isolate compounds of putative biological activity for further investigation. The comparison of the chemical profiles of closely related species *T. speciosa* (Schreb.) Baumg., *B. salicifolium* L. and *X. speciosissima* was done to add some chemophenetic data to the recently rearranged taxonomic classification within the Inuleae tribe.

The first part of phytochemical analysis included the separation of the obtained chloroform and hydroalcoholic extracts by chromatographic methods: CC, TLC, pTLC, RP-HPLC-UV, and identification of the extract components by RP-HPLC-DAD and UHPLC-MSⁿ. Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) experiments were performed for the compounds isolated in quantities sufficient for spectral studies. For the metabolites previously not described in the literature, full spectral analysis (1D and 2D NMR, HRESIMS) was performed to determine their chemical structures.

Chromatographic separation of non-polar extract from roots of *X. speciosissima* led to the isolation of five monoterpenoid thymol derivatives, including three known (8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxythymol, 7,10-diisobutyryloxy-8,9-epoxythymol isobutyrate, 10-isobutyryloxy-7-isovaleryloxy-8,9-epoxythymol isobutyrate) and two new compounds (8-hydroxy-9-isobutyryloxy-10-isovaleryloxythymol and 8-hydroxy-9,10-diisovaleryloxythymol). Sesquiterpene lactones (2,3-dihydroaromaticin, 2-deoxy-4-*epi*-pulchelin, santamarine and reynosin) and one apocarotenoid - loliolide were isolated from the chloroform extract of the aerial parts of the plant. The hydroalcoholic extracts from roots and aerial parts of *X. speciosissima*, analyzed by the UHPLC-DAD-MSⁿ method, revealed the presence of caffeoylquinic and caffeoylhexaric acids and their esters with short-chain organic

acids. Additionally, in the extract from the aerial parts, glycosidic derivatives of kaempferol and quercetin were identified. *X. speciosissima* inflorescences were the source of caffeic acid and its derivatives (mainly 5-*O*-caffeoylquinic acid and 1,5-di-*O*-caffeoylquinic acid), flavonoids (glycosides of quercetin, kaempferol, 6-hydroxyquercetin, and 6-hydroxykaempferol), derivative of dehydrodiconiferyl alcohol and protocatechuic acid.

Comparative analysis of polyphenolic metabolites produced by three closely related species: *T. speciosa*, *B. salicifolium* and *X. speciosissima* showed that the accumulation of caffeoylhexaric acids is characteristic of *X. speciosissima*. Esters of caffeoylquinic acids with isobutyric and methylbutyric acids are present only in *B. salicifolium* and *X. speciosissima*, while *T. speciosa* was the only species containing 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid. The results, together with the results of isolation work, confirmed the correctness of the recently accepted taxonomic classification distinguishing *Xerolekia* as a new monotype genus.

Five known germacrane-type sesquiterpene lactones (two of them were described as new compounds in 2018) and one oxylipin - *trans*-12-oxo-phytodienoic acid (12-OPDA) were isolated from the chloroform extract of aerial parts of *C. divaricatum*. Caffeoylhexaric and caffeoylquinic acids and their esters were identified in the hydroalcoholic extract analyzed by UHPLC-DAD-MSⁿ method. Constituents of the extract indicated a close systematic relationship between *Xerolekia* and *Carpesium* genus.

The next step was to perform screening tests for the biological activity of the isolated compounds. Based on the isolation yields, structural similarities to the compounds of known biological activity and literature data, seven compounds were selected for further investigation: three monoterpenoid thymol derivatives, three sesquiterpene lactones and 12-OPDA.

Antibacterial activity of two thymol derivatives isolated from *X. speciosissima*:
8-hydroxy-9-isobutyryloxy-10-isovaleryloxythymol and

10-isobutyryloxy-7-isovaleryloxy-8,9-epoxythymol isobutyrate against *Staphylococcus aureus* was assessed using Kirby-Bauer disc diffusion test. Despite the formerly described anti-staphylococcal activity of 8-hydroxy-9,10-diisobutyryloxythymol, the examined compounds showed no antimicrobial activity.

Anti-inflammatory effects were investigated for 12-OPDA, cardivarolide G, 4 β ,8 α -dihydroxy-5 β -angeloyloxy-9 β -(2-methylbutyryloxy)-3-oxo-germacran-6 α ,12-olide and 7,10-diisobutyryloxy-8,9-epoxythymol isobutyrate. In the concentration range of 0.5-2.5 μ M, none of the mentioned compounds demonstrated cytotoxic effect on the isolated neutrophils. The tested plant metabolites significantly reduced the release of ROS and pro-inflammatory cytokines by human neutrophils stimulated within LPS or f-MLP.

Two tests of cytotoxic activity against tumor cell lines were performed. The MTT test was conducted using two lines of osteosarcoma: U-2 OS (wild line) and SAOS-2 (with the deletion of the p53 gene). Three panels of cells, each including human cancer and normal cell lines, were used in the LDH test. The MTT test showed a slightly stronger cytotoxic effect of cardivarolide G against osteosarcoma cells than that exerted by 4 β ,8 α -dihydroxy-5 β -angeloyloxy-9 β -(2-methylbutyryloxy)-3-oxo-germacran-6 α ,12-olide, after 24 and 48 h. It was also observed that the doxorubicin used as the reference compound was more potent than both tested compounds. The third of the isolated germacranolides - 4 β ,8 α -dihydroxy-5 β -isobutyryloxy-9 β -(3-methylbutyryloxy)-3-oxo-germacran-6 α ,12-olide was tested in the LDH test and showed moderate activity against all tested cell lines, including the lines of normal cells.

Phytochemical analyzes of *X. speciosissima* and *C. divaricatum* revealed the presence of known plant metabolites and compounds previously unknown from nature. A number of compounds was identified for the first time as metabolites of the plants belonging to the studied taxa. Majority of the *X. speciosissima* metabolites possess biological activity that is well documented in the literature. This suggests that the

plant may have medicinal properties, and the obtained results indicate its anti-inflammatory effect. The results of experiments conducted for compounds derived from *C. divaricatum* partly explained the anti-inflammatory effect of the plant and confirmed the moderate non-selective cytotoxic activity of the tested germacranolides.