

Chrysanthemum balsamita var. *tanacetoides* fitokémiai elemzése

¹VARGA ERZSÉBET*, ¹ORBÁN KRISZTINA, ¹FINTA ADÉL, ²KURSINSZKI LÁSZLÓ,
³DOMOKOS ERZSÉBET

¹Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógyszerészeti Kar, Farmakognózia és fitoterápia tanszék,
540139 Tîrgu Mureş, Gh.Marinescu 38.

²Semmelweis Egyetem, Farmakognózia Intézet, Üllői út 26, 1085 Budapest

³Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógyszerészeti Kar, Gyógyszerészeti botanika tanszék,
540139 Tîrgu Mureş, Gh.Marinescu 38

*Levelezési cím: erzsebet.varga@umftgm.ro

Summary

Varga E., Orbán K., Finta A., Kursinszky L., Domokos E.: **Phytochemical analysis of *Chrysanthemum balsamita* var. *tanacetoides***

Introduction: *Chrysanthemum balsamita* L. it is originated from South-West Asia. It has been introduced to Europe where it is known as a medicinal, aromatic and decorative plant. The herba of the plant contains the following compounds: essential oils, flavonoids, triterpene saponins, isoflavones, bitter material, polyphenolic components.

Aim: The aim of the study was to determine the antioxidant capacity of a variant of the *Ch. balsamita* species (var. *tanacetoides*) and its correlation with phenolic compounds.

Materials and methods: The herba of the *Ch. var. tanacetoides* was collected from the University Medicinal Garden. Extraction from the herba was made with methanol, methanol-water (1:1) and water. For each extract, total polyphenol and total flavonoid content was determined. The tannins were determined spectrophotometrically from aqueous extract. The flavonoid-O-glycoside content was determined based on flavonoid-aluminum chloride ($AlCl_3$) complexation and measured by spectrophotometry. The antioxidant capacity was determined by the ABTS method.

Results: The highest polyphenol (65.4 mg gallic acid / 100 g drug) and flavonoid (21.58 mg quercetin / 100 g drug) contents were obtained from the methanol:water (1:1) extract. The polyphenol concentration in the herba expressed in pirogallol was 1.710 g%, while the tannin concentration was 0.727 g%. The concentration of flavonoid-O-glycoside expressed in hyperoside was 0.39 g%. Methanol extract had the highest antioxidant activity ($IC_{50}=0.0012$ mg/ml), followed by the water extract ($IC_{50}=0.0020$ mg/ml) and the methanol:water (1:1) extract ($IC_{50}=0.1060$ mg/ml).

Conclusions: The methanol:water (1:1) solvent proved to be the best for the extraction of polyphenols and flavonoids in high quantities, but the antioxidant capacity showed the lowest value for the methanol:water (1:1) extract. Testing the antioxidant capacity with other methods and qualitative analysis of the extracts are necessary.

Keywords: *Chrysanthemum balsamita* var. *tanacetoides*, polyphenols, flavonoids, antioxidant capacity, ABTS

Összefoglalás

Bevezetés: A *Chrysanthemum balsamita* L. Dél-Nyugat Ázsiából származik. Európába behozott faj, kultúrnövényként, gyógy- és fűszernövényként ismert. A növény herbája a következő vegyületeket tartalmazza: illóolajat, flavonoidokat, triterpén szaponinokat, izoflavonoidokat, keserűanyagot, polifenolos komponenseket.

Célkitűzés: Célunk meghatározni a *Ch. balsamita* faj egyik változatának (var. *tanacetoides*) az antioxidáns kapacitását és annak összefüggését a fenolos vegyületekkel.

Módszerek: A herbát a Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem Gyógynövénykertjében termesztett *Ch. balsamita* var. *tanacetoides* egyedekről gyűjtöttük. A herbából a kivonatokat metanollal, metanol-víz (1:1) elegyével és vízzel készítettük. Minden kivonatra meghatároztuk az összpolicenol és összflavonoid tartalmat. A cserzőanyag meghatározása spektrofotometriás módszerrel történt, vizes kivonatból. A flavonoid O-glikozidokat $AlCl_3$ -al történő komplexképzéssel és spektrofotometriás módszerrel mértük. Az antioxidáns kapacitást ABTS módszerrel határoztuk meg.

Eredmények: A legmagasabb polifenol (65,4 mg galluszsav/100 g drog) és flavonoid (21,58 mg kvercetin/100 g drog) tartalmat a metanolos-vizes (1:1) kivonatokból mértük. A herba polifenol koncentrációja pirogallolban kifejezve 1,710 g%, a cserzőanyagé 0,727 g%. A herba flavonoid-O-glikozid koncentrációja hiperozidban kifejezve 0,39 g%. A legnagyobb antioxidáns aktivitással a metanolos kivonat rendelkezett ($IC_{50}=0,0012$ mg/ml), majd ezt követte a vizes kivonat ($IC_{50}=0,0020$ mg/ml) és a metanolos-vizes (1:1) kivonat ($IC_{50}=0,1060$ mg/ml).

Következtetések: A polifenolok és flavonoidok legnagyobb mennyiségben való kivonására a metanolos-vizes (1:1) módszer bizonyult a legjobbnak, viszont az antioxidáns kapacitás a legalacsonyabb értéket mutatta a metanolos-vizes kivonat esetében. Szükséges az antioxidáns kapacitás tesztelése más módszerekkel is, illetve a kivonatok minőségi analízise.

Kulcsszavak: *Chrysanthemum balsamita* var. *tanacetoides*, polifenolok, flavonoidok, antioxidáns kapacitás, ABTS

Bevezetés

A *Chrysanthemum balsamita* L., magyar nevén boldogasszony mentája, boldogasszony tenyere vagy balzsamos aranyvirág, Melius Péter Herbáriumában megtalálhatók már ezek a megnevezések [1]. A népi gyógyászatban, Székelyföldön és a csángó vidékeken nevezik még vénasszony bűzlentyűjének is [2].

Az Asteraceae családba és a *Chrysanthemum* genusba tartozik. Dél-Nyugat Ázsiából származik. Európába behozott faj, kultúrnövényként, gyógy- és fűszernövényként ismert. Gyakran természetünk nálunk az országban és dísznövényként fordul elő kertekben, temetőben [3, 4].

A *Ch. balsamita* (L.) Baillon syn. *Tanacetum balsamita* L. egy lágyszárú évelő faj. Szára 60-120 cm magas, zöld, szőrös, felső részén elágazó. Tölevelei hosszú levéllyel rendelkeznek, tojásdad-elliptikusak, enyhén csipkés szélűek. A szárlevelek közül az alsók nyelesek, a felsők ülők. A levéllemez az alsó felén néha 1-4 karéjos lehet. A leveleken T alakú védőszőrök és rövid mirigyszőrök vannak. Fészkés sátor vagy fészkés buga virágzata van. A fészekben 6-10 mm átmérőjű csöves virágok (*Ch. balsamita* var. *tanacetoides*) ülnek. A központi elhelyezkedésű csöves (kög) virágok mellett a fészek szélén megjelenhetnek, fehér színű, 10-16 mm átmérőjű nyelves (sugár) virágok (*Ch. balsamita* var. *balsamita*). Késő ősszel virágzik. Hengeres kaszattermései 5 bordájúak és rövid (0,2-0,4 mm) repítőszőrrel rendelkeznek. Illata mentára emlékeztet. Genetikailag jellemezve a *Ch. balsamita* var. *tanacetoides* poliploid ($2n=54$, $x=9$), míg a *Ch. balsamita* var. *balsamita* diploid ($2n=18$) taxon [3,4,5,6].

A *Chrysanthemum balsamitae* herba-t a népgyógyászat kolagog-koleretikus és májvédő tulajdonságáért használja, de ismert diuretikus, adstringens, sztomahikus, féregűző, görcsoldó, karmínatív és emenagóg hatása is [7, 8]. Használják külsőleg rovarcsípések kezelésére is [2].

A fitoterápiában sikeresen alkalmazzák kolagog-koleretikus és májvédő tulajdonságáért, de tudományos kutatások tárgyát képezik kivonataik, májvédő hatásukért. Állatkísérletekkel igazolták a májra kifejtett pozitív hatást, csökkentve a szteatózist, normalizálva az enzimműködést [9]. Antimikrobás hatását 14 mikroorganizmusra vizsgálták (9 baktérium, 2 gomba, 3 penész fajra) [10].

A növény herbája eddigi ismereteink szerint a következő vegyületeket tartalmazza: illóolajat, triterpén szaponinokat, flavonoidokat, izoflavo-

noidokat, keserűanyagot és polifenolos komponenseket [11, 12].

Illóolajában, az egyik fontosabb, nagymennyiségben található, farmakológia hatással bíró vegyület a karvon [13, 14, 15]. A közel 200 leírt illóolaj komponens közül megemlítjük a legismertebbeket: 1,8 cineol, α -tujon, 1,8-cineol, α -pinen, β -pinen, kámfén, kámfor, szabinén, p-cimen, limonen, β -tujon, pinokarvon, transzszabinol, ciszkrizantenol, ciszpinokarveol, mirtenol, mirtenil-acetát, stb. [11, 16].

Az Asteraceae családra jellemző szeszkviterpén laktonok újabb kilenc frakcióját sikerült azonosítani a Bulgáriában termesztett kemotípusokból [17].

Triterpén glikozidjai hidrolízissel gipszogenin aglikont eredményeznek [7]. Polifenolos komponensei (klorogénsav, dikaffeol-kínasav, trihidroxidimetiloxiflavon, tetrahidroxidimetoxiflavonol) magas antioxidáns aktivitással rendelkeznek, mely a hidroxil csoportoknak sajátos megoszlásával magyarázható, reaktív peroxid gyök megkötéssel. A polifenolok kelatáló struktúrák, képesek átmeneti fémekeket megkötni, elsősorban nehézfémeket környezetünkben. Potenciális antioxidáns tulajdonságot tulajdonítanak a növényi kivonatoknak, elsősorban funkcionális élelmiszerekben lenne jelentőségük [18, 19, 20].

Egy előzetes mérésünk alapján a Szegedi Tudományegyetemen 2008-ban az illóolajokból mindkét tanulmányozott növényi részben a karvon volt a domináló komponens: a *Ch. balsamitae* foliumban 68,42%-ban; a *Ch. balsamitae* flosban 74,67%-ban volt jelen a karvon. Kísérő frakciók a limonen, az α -tujon és az 1,8 cineol [21, 11].

A *Ch. balsamita* var. *tanacetoides* herba fitokémiai elemzésének érdekében a következő célokat tűztük ki: a herbából metanolos, vizes és metanolos:vizes (1:1) kivonatok készítése, amelyekből meghatároztuk a herba összpolidfenol, összflavonoid, továbbá a herba cserzőanyag és flavonoid-O-glikozid tartalmát; valamint a kivonatok antioxidáns hatásának meghatározása ABTS módszerrel.

Anyag és módszer

Növényi részek gyűjtése

A növényi részeket (herba) a Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógynövénykertjében termesztett *Ch. balsamita* var. *tanacetoides* egyedekről gyűjtöttük (hiányoznak a fehér nyelves virágok) 2016 nyarán, a növény teljes virágzása idején (1. ábra). A gyűjtött növényi részeket (her-



1. ábra: *Chrysanthemum balsamita* var. *tanacetoides* a MOGYE Gyógynövénykertjében (Fotó: Varga Erzsébet, 2016)

ba), természetes körülmények között szárítottuk és a kivonatok elkészítéséig tároltuk a MOGYE, Farmakognózia és fitoterápia tanszékén.

Extrakció és mintakészítés a fenolos komponensek kivonására

A kivonatokat metanollal, metanol-víz (1:1) eleggyel és vízzel készítettük. A drogot (2,5 g) dörzsmozsárban szétdörzsöltük és 25 ml oldószerrel kezeltük. A kivonatokat ultrahangos vízfürdőben 30 percig 25°C-on tartottuk, azután szűrtük, majd 25 ml-es mérőlombikokban a megfelelő oldószerrel feltöltöttük a jelig. A kivonatokat szűrtük és hűtőszekrényben (3–4°C-on) ampullákba töltve tároltuk a mérésekig.

Összpolifenol tartalom meghatározása

Folin-Ciocalteu módszerrel dolgoztunk (*Singleton és munkatársai*, 1999) [22]. Az előre elkészített 40 µl kivonathoz, 3,16 ml desztillált vizet és 200 µl Folin-Ciocalteu reagenst adtunk, homogenizáltuk, majd 5 perc eltelte után 600 µl 20% w/v nátrium karbonátot adtunk hozzá. Az így készített kivonatokat 2 órán át szobahőmérsékleten (20°C) állni hagytuk majd kompenzáló oldattal (víz és reagens) szemben 765 nm-en mértük az abszorbanciát (spektrofotométer UV-VIS SPECORD 210). Az eredményeket mg galluszsav ekvivalensben 100 g drogra vonatkoztatva határoztuk meg.

Cserzőanyag meghatározása

A cserzőanyag tartalom meghatározása a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv bőrporos spektrofotometriás

módszerével történt [23] vizes kivonathoz (3 párhuzamos mérés), pirogallol összehasonlító oldat felhasználásával. A cserzőanyag tartalmát (% g/g) pirogallolban kifejezve számoltuk.

Összflavonoid tartalom meghatározása

A kivonatok összflavonoid tartalmát kolorimetriás módszerrel határoztuk meg (X. Román Gyógyszerkönyv *Cynarae folium* monográfiájánál leírt módszerrel, kisebb módosításokkal) [24]. Az 500 µl kivonathoz 1 ml 10% w/v nátrium acetátot, 600 µl 2,5% w/v AlCl₃-ot, 1,4 ml metanolt és 1,5 ml vizet adtunk. Az oldatokat homogenizáltuk és 15 percig állni hagytuk szobahőmérsékleten (20°C), majd 430 nm-en leolvastuk az abszorbanciát nátrium acetát, aluminium klorid, metanol és vízzel szemben. Az eredményeket mg kvercetin ekvivalensben fejeztük ki 100 g drogra.

Flavonoid-O-glikozidok meghatározása

A hiperozidban kifejezett flavonoid tartalmát a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv, O-glikozidok mérésére alkalmas, AlCl₃-al történő komplexképzésen alapuló, spektrofotometriás módszerrel mértük, a *Sambuci flos* monográfiájánál leírtak szerint [23]. Három párhuzamos mérést végeztünk és száraz drogra vonatkoztatva határoztuk meg a koncentrációt.

Antioxidáns vizsgálati módszer ABTS-sel

Az ABTS (2,2'-diazino-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfonsav) és kálium perszulfát reakciója eredményezte gyök-kation képződésén alapszik a mérés. 10 mg ABTS tablettát oldunk 2,6 ml káliumperszulfát törzsoldatban. Az ABTS• + oldatot spektroszkópiai minőségű metanollal hígítottuk, hogy az oldat abszorbanciája 0,900 ± 0,05 legyen 734 nm-en. 2,5 ml ABTS•-t tartalmazó oldathoz a minták különböző mennyiségét adtuk (10–50 µl). A gátlási intervallum 20–80% között kell legyen. Az abszorbanciaértékeket 6 perc után mértük [25]. A minták antioxidáns kapacitását, grafikus módszerrel Excel-ben határoztuk meg.

Minden mérést három párhuzamosból végeztünk. Kiszámoltuk az IC₅₀-et, ez az antioxidáns koncentrációt (kivonat) jelöli, amely az ABTS gyök mennyiségének 50%-os csökkenéséhez szükséges.

I. táblázat

Chrysanthemum balsamitae herba kivonatok polifenol és flavonoid tartalma (n=3) (Folin-Ciocalteu és a Cynarae folium monográfiájánál leírt módszer)

| Kivonatok | Polifenolok mg GSE/100 g drog ^a | Flavonoidok mg KVE/100 g drog ^b |
|----------------------------------|---|---|
| metanolos | 11,19±1,21 | 8,04±0,54 |
| metanolos vizes (1:1, v/v) elegy | 65,40±4,51 | 21,58±3,11 |
| vizes | 29,03±3,21 | 16,38±1,75 |

^a GSE=galluszsav ekvivalens

^b KVE=kvercetin ekvivalens

II. táblázat

A Chrysanthemum balsamitae herba polifenol-, cserzőanyag- és flavonoid-O-glikozid tartalma (n=3) a Ph. Hung. VIII. szerint

| Fenolos komponensek | Koncentráció g% (pirogallol) |
|----------------------|---------------------------------|
| polifenol | 1,710±0,170 |
| cserzőanyag | 0,727±0,023 |
| | Koncentráció g%(hiperozid) |
| flavonoid-O-glikozid | 0,390±0,080 |

Gátlás képlete = $(A_o - A_t) / A_o \times 100$, ahol az A_o = ABTS oldat abszorbanciája 0 időpontban és az A_t = ABTS és minta keverék abszorbanciája 360 másodperc után.

Eredmények

A polifenol tartalom megadása a galluszsavban kifejezett g/g százalékos koncentrációval történt. A galluszsav kalibrációs egyenes egyenlete a következő volt: $y = 0,044x + 0,0057$ ($R^2 = 0,9906$). Az összflavonoid tartalmat kvercetinben fejeztük ki és a kalibrációs egyenes egyenlete a következő volt: $y = 0,156x - 0,1676$ ($R^2 = 0,9954$) (I. táblázat).

A hiperozidban kifejezett flavonoid tartalom és a pirogalloban kifejezett cserzőanyag- és polifenol tartalom eredményei a II. táblázatban találhatóak. Az ABTS antioxidáns mérés adatait a III. táblázatban összegeztük.

Eredményeink kiértékelésénél figyelembe vettük a nemzetközi szakirodalomban közölt adatokat. Benedec és munkatársai Kolozsavárról 2016-ban [26] a *Ch. balsamitae* var. *balsamita* és var. *tanacetoides* etanolos kivonatainak flavonoid és polifenol tartalmát vizsgálták, melynek során eredményeinkhez képest kisebb értékeket kaptak. Alexieva és munkatársai 2013-ban [12] Bulgáriában *Ch. balsamitae herba* dekortumokat vizsgáltak (0,48-0,60 mg galluszsav/g fagyasztott növény), így eredményeinket nem tudtuk összehasonlítani. Szintén az említett országból, Popova 2014-ben [27] az etanolos kivonatok galluszsavban kifejezett polifenoltartalomra

III. táblázat

A Chrysanthemum balsamitae folium antioxidáns kapacitása (n=3)

| Kivonatok | ABTS IC ₅₀ mg/ml |
|----------------------------|-----------------------------|
| metanolos | 0,0012 |
| metanolos vizes (1:1, v/v) | 0,1060 |
| vizes | 0,0020 |

0,89 mg/friss súly értéket kapott. Ez az érték alacsonyabb a metanolos, metanolos-vizes és vizes kivonattal elért eredményeinknél.

A Román Gyógyszerkönyvben [24] hivatalos *Ratanhiae radix* cserzőanyagtartalmához viszonyítva a *Ch. balsamitae herbae* 83%-kal alacsonyabb. A szintén hivatalos *Crataegi folium cum flore* droghoz képest a hiperozidban kifejezett flavonoid tartalom 35%-kal kevesebb az általunk vizsgált droghoz.

Az antioxidáns mérések ABTS módszerével a metanolos és a vizes kivonatok bírnak magas antioxidáns kapacitással, kevésbé a metanolos:vizes (1:1) kivonatok. Méréseinket kevésbé tudjuk összehasonlítani Popova és mtsai 2014-es eredményeivel [27], akik az etanolos kivonatokból végeztek meghatározásokat (11,61±0,25 µM TE/friss növény, troloxban kifejezve).

Következtetések

A legmagasabb polifenol- és flavonoid tartalmat a metanolos-vizes (1:1) kivonatból mértük, ami nem járt együtt egyben magas antioxidáns kapacitással, ellenkezőleg, utóbbi értéke ebben a kivonatan volt a legalacsonyabb. A metanolos kivonatból számoltuk a legkisebb összpolfenol- és flavonoid tartalmat, ugyanakkor ez a kivonatan bizonyult magas antioxidáns kapacitásúnak.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket fejezzük ki az Erdélyi Múzeum Egyesület és Semmelweis Egyetemnek (52.2/P.2.EMEOGYSZ/ 01.02.2016).