

## Badania fitochemiczne ziela okrzężnicy bagiennej *Hottonia palustris* L. oraz ocena jej aktywności biologicznej

Rodzaj *Hottonia* L. we florze Polski reprezentowany jest przez jeden gatunek - okrzężnica bagiczna *Hottonia palustris* L. (Primulaceae). Fragmentarycznie udokumentowany skład chemiczny i nieliczne doniesienia o etnofarmakologii surowca stały się celem do podjęcia przekrojowych badań fitochemicznych i oceny aktywności biologicznej gatunku. W wyniku wielostopniowych rozdziełów chromatograficznych uzyskano 19 związków zidentyfikowanych jako 1,3-difenylopropan-1,3-dion (**1**), 5-hydroksyflawon (**2**), 5-hydroksy-2'-metoksyflawon (**3**), 5-hydroksy-2',6'-dimetoksyflawon (**4**), 5-hydroksy-2',3',6'-trimetoksyflawon (**5**), 2',5-dihydroksy-6'-metoksyflawon (**6**), 5,6'-dihydroksy-2',3'-dimetoksyflawon (**7**), 5,6,2',6'-tetrametoksyflawon (**8**), 2'-O- $\beta$ -glukopiranozyd 5,2'-dihydroksyflawonu (**9**), 6-O-(6''-O- $\beta$ -glukopiranozylo)- $\beta$ -glukopiranozyd 5,6-dihydroksyflawonu (**10**), 5,2'-dihydroksyflawon (**11**), 5,6-dihydroksyflawon (**12**), 5,7-dihydroksyflawon (**13**), 7-O-(2''-O- $\beta$ -glukuronido)- $\beta$ -glukopiranozyd apigeniny (**14**), 3-O-(6''-O- $\alpha$ -ramnopiranozylo)- $\beta$ -glukopiranozyd kemferolu (**15**), 3-O-(6''-O- $\beta$ -ksylopiranozylo)- $\beta$ -glukopiranozyd kemferolu (**16**), kemferol (**17**), 3-O-(6''-O- $\beta$ -ksylopiranozylo)- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny (**18**) i 3-O-(6''-O- $\alpha$ -ramnopiranozylo)- $\beta$ -glukopiranozyd kwercetyny (**19**). Siedem z wyizolowanych związków zostało opisanych po raz pierwszy (**4-7**, **9-10**, **14**), a dla dwóch związków (**16**, **18**) po raz pierwszy podano niektóre nowe dane spektralne. Struktury związków **1-19** zostały ustalone w oparciu o wyniki analiz spektralnych oraz spektroskopowych (UV, MS,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT, COSY, ROESY, HSQC, HMQC, HMBC), jak również analizy krystalograficzne. Charakterystyka fitochemiczna z zastosowaniem techniki LC-HRMS sporządzonych ekstraktów i frakcji wykazała obecność 31 substancji. W ekstraktach dominowały pochodne 5-hydroksyflawonu jak również pochodne flawonu i flawonolu w postaci diglikozydów. Analizy umożliwiły wskazanie substancji, których rolę można określić jako wskaźniki chemofenetyczne rodziny Primulaceae, z grupy flawonoidów zapotynę i primuletynę oraz saponin triterpenowych. Zoptymalizowana i zwalidowana nowa metoda analityczna HPLC-PDA posłużyła do ilościowego scharakteryzowania lipofilowych ekstraktów, w których dominowała zapotyna. Spektrofotometryczne oznaczenia ilościowe polifenoli (TPC), flawonoidów (TFC), kwasów fenolowych (TPAC) i tanin (TTC) wskazały na frakcję octanową (**HP4**) jako najbogatszą w polifenole  $67.81 \pm 2.02$  mg  $P_{eq}/g$  ekstraktu. Frakcja flawonoidowa była dominującą w wyciągu benzynowym (**HP6**)  $9.23 \pm 0.12$  mg  $L_{eq}/g$  ekstraktu, kwasy fenolowe dominowały w wyciągu chloroformowym (**HP7**)  $3.48 \pm 0.21$  mg  $CA_{eq}/g$  ekstraktu, a przewagę garbników obserwowano we frakcji *n*-butanolowej (**HP5**)  $5.40 \pm 0.86$  mg  $P_{eq}/g$  ekstraktu. Następnym etapem badań obejmował ocenę aktywności biologicznej wyciągów, frakcji oraz czystych związków w kierunku aktywności antyoksydacyjnej (DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC), a także ich potencjalnego hamowania acetylocholinoesterazy. Zaobserwowano korelację pomiędzy zawartością głównych grup związków, a wysoką zdolnością do redukcji wolnych rodników z maksymalnym efektem dla **HP4** w teście DPPH i ABTS -  $452.16 \pm 4.37$   $\mu\text{M } T_{eq}$  i  $1132.21 \pm 2.5$   $\mu\text{M } T_{eq}$  oraz **HP7**  $494.35 \pm 4.83$   $\mu\text{M } T_{eq}$  i  $1099.42 \pm 3.25$   $\mu\text{M } T_{eq}$ . Kemferol i glikozydy kwercetyny wykazywały znaczącą aktywność przeciwwolnorodnikową jak również 5,6-dihydroksyflawon. Badanie zdolności hamowania acetylocholinoesterazy wykazało umiarkowany efekt dla związków, z wyróżniającą się aktywnością dibenzoilometanu (**1**) oraz wyższą aktywnością ekstraktów i frakcji z najaktywniejszą frakcją octanową (**HP4**). W drugim testowanym modelu biologicznym oceniono efekt cytotoksyczny oraz wpływ na syntezę DNA komórek raka płaskonabłonkowego języka SCC-25 oraz fibroblastów. Wartości  $IC_{50}$  po 48 h inkubacji dla ekstraktów (**HP6**,  $IC_{50} = 14,9$  g/mL; **HP7**,  $IC_{50} = 16,7$   $\mu\text{g/mL}$ ) osiągała połowę skuteczności cisplatyny, zastosowanej jako kontrolę pozytywną ( $IC_{50} = 7,58$   $\mu\text{g/mL}$ ). Szczególną aktywność wykazały związki **1** ( $IC_{50}$ ,  $29,1 \pm 1,45$   $\mu\text{M}$ ), związek **7** ( $IC_{50}$ ,  $40,60 \pm 1,65$   $\mu\text{M}$ ) oraz związek **8** ( $IC_{50}$ ,  $20,33 \pm 1,01$   $\mu\text{M}$ ). Oceniono również najbardziej aktywne związki i ekstrakty pod kątem ich wpływu na biosyntezę DNA. Stwierdzono, że wszystkie badane próbki w czasie 48 h inkubacji z komórkami SCC-25 indukowały aktywność hamującą biosyntezę DNA. Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w dostępną wiedzę o chemizmie i potencjalnej aktywności biologicznej okrzężnicy bagiennej dając podstawy do dalszych zaawansowanych badań eksperymentalnych.