

ВИЗНАЧЕННЯ АРИСТОЛОХІЄВОЇ КИСЛОТИ І У ГУСТОМУ ЕКСТРАКТІ З ТРАВИ ХВИЛІВНИКУ ЗВИЧАЙНОГО МЕТОДОМ ВЕРХ ТА ВСТАНОВЛЕННЯ ЙОГО ЦИТОТОКСИЧНОЇ АКТИВНОСТІ

Погодіна Л.І., Бурда Н.Є.

Кафедра хімії природних сполук і нутриціології
Національного фармацевтичного університету
e-mail: cnc@nuph.edu.ua

Вступ. Хвилівник звичайний (*Aristolochia clematilis* L.) – багаторічна трав'яниста рослина з коротким кореневищем і характерним запахом. У різних країнах світу, зокрема в Україні, ця рослина вирощується як декоративна або зустрічається як бур'ян [1].

Хімічний склад сировини хвилівнику звичайного представлений різними класами біологічно активних речовин, зокрема аристолохієвими кислотами [1].

Серед 8 аристолохієвих кислот, які зустрічаються у представників роду Хвилівник, більшою мірою накопичуються аристолохієва кислота І та ІІ (рис. 1-2).

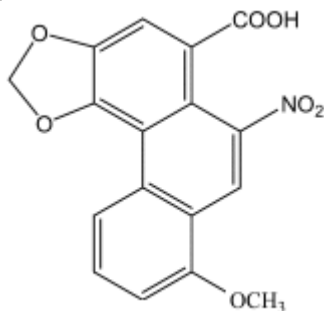


Рис. 1. Аристолохієва кислота І (8-метокси-6-нітрофенантро[3,4-d][1,3]діоксол-5-карбонова кислота)

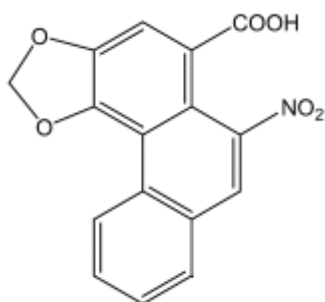


Рис. 2. Аристолохієва кислота ІІ (6-нітрофенантро[3,4-d][1,3]діоксол-5-карбонова кислота)

Аристолохієва кислота І – найпоширеніша аристолохієва кислота, виявлена майже в усіх видах роду Хвилівник, у тому числі і у хвилівнику звичайного.

Тому в попередніх дослідженнях нами було методом ВЕРХ визначено наявність та кількісний вміст у траві та коренях хвилівнику звичайного аристолохієвої кислоти І [2].

Відомо, що сировина хвилівнику звичайного є токсичною, зокрема завдяки вмісту аристолохієвих кислот.

Дослідженнями, проведеними різними науковцями, встановлено, що аристолохієві кислоти можуть викликати нефропатію, яка характеризується інтерстиціальним фіброзом, атрофією проксимальних канальців і гіпоксією [3, 4].

Німецькими вченими визначено, що настойки на основі сировини хвилівнику звичайного інгібують синтез ДНК у клітинах НерG2 гепатоми людини у дозозалежний спосіб. Цю активність пов'язують із вмістом аристолохієвої кислоти І. Тому проведено експеримент щодо встановлення цитотоксичності та генотоксичності аристолохієвої кислоти І у клітинах НерG2. Аристолохієва кислота І утворювала аддукти ДНК, індукувала хромосомні аберації та розриви ланцюгів ДНК. Пошкодження ДНК, спричинене аристолохієвою кислотою І, призвело до зупинки клітин у S-фазі [5].

Тому, продовжуючи дослідження щодо перспективності використання сировини цієї рослини у медицині, нами було одержано густий екстракт з трави хвилівнику звичайного.

Метою роботи було визначення аристолохієвої кислоти І у густому екстракті з трави хвилівнику звичайного та визначення його цитотоксичної активності.

Матеріали та методи. Для дослідження використовували густий екстракт, одержаний з трави хвилівнику звичайного, заготовленої у період цвітіння.

Технологія одержання густого екстракту з трави хвилівнику звичайного така: наважку здрібненої на порошок сировини вмішували в конічну колбу і додавали як екстрагент 70 % етанол. Спочатку настоювали протягом 1 години при кімнатній температурі, потім нагрівали зі зворотнім холодильником протягом 2 годин при температурі 60°C. Далі одержану витяжку охолоджували, фільтрували та висушували до отримання густого екстракту.

Хроматографічне вивчення густого екстракту з трави хвилівнику звичайного проводили на рідинному хроматографі, обладнаному діодноматричним детектором Shimadzu HPLC-system, ser.20 в таких умовах:

- колонка Xterra MS C18, розміром 150 мм x 4,6 мм, розмір частинок 3,5 мкм;
 - температура колонки – 400С;
 - довжина хвилі детектування – 390 нм;
 - швидкість потоку рухомої фази – 0,3 мл/хв;
 - об'єм проби, що вводився – 25 мкл;
 - рухома фаза наведена у таблиці 1.
- Суміш розчинників: ацетонітрil – вода (50:50).

Таблиця 1. Рухомі фази для проведення хроматографічного аналізу

Час хроматографування, хв	Елюент А, ¹ %	Елюент В, ² %
0–25	85 → 35	15 → 65
25–30	35 → 0	65 → 100
30–31	0 → 85	100 → 15

Примітки: ¹ Елюент А: 0,1 % водний розчин трифтороцтової кислоти. ² Елюент В: 0,1 % розчин ацетонітрилу в трифтороцтовій кислоті.

Розчин порівняння: наважку стандартного зразка аристоксієвої кислоти І (ChemFaces, China, Catalog No.CFN99505) 1 мг розчиняли в суміші розчинників і доводили до позначки тим самим розчинником. 1 мл отриманого розчину переносили в колбу на 10 мл і доводили сумішню розчинників до позначки. Розчин фільтрували через фільтр 0,45 мкм.

Ідентифікацію компонентів проводили за часом утримування та відповідності УФ-спектру стандартній речовині.

Розрахунки проводили за формулою, %:

$$X, \% = \frac{A_{pr} \times m_{st} \times V_{pr} \times P \times 100}{A_{st} \times V_{st} \times m_{pr} \times 100}$$

A_{pr} – площа піку речовини на хроматограмі випробовуваного розчину;

A_{st} – площа піку речовини на хроматограмі розчину порівняння;

m_{st} – маса стандартного зразка речовини, мг;

m_t – маса рослинної сировини, мг;

V_{pr} – розведення досліджуваного розчину, мл;

V_{st} – розведення розчину порівняння, мл;

P – активність стандарту, % [2].

Визначення цитотоксичної активності проводили на моделі *in vitro* у Національному фармацевтичному університеті на базі проблемної лабораторії морфофункціональних досліджень, під керівництвом д.біол.н., професора Малоштан Л.М.

У дослідженні використано лінію перещеплюваних культур клітин тварин ВНК-21 (Baby Hamster Kidney) – культура клітин фібробластоподібного типу нирки новонародженого сирійського хом'яка. Лінія клітин ВНК-21 придбана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України. Цитотоксичний вплив екстракту з трави хвилівнику звичайного проводили в стандартних 24-ямковий планшетах. Цитотоксичний вплив оцінювали по зниженню проліферації клітин в тесті з генціанфіолетом [6, 7].

Результати та обговорення. Хроматограма виявлення аристоксієвої кислоти І у досліджуваному об'єкті наведена на рис. 3. Хроматографічні параметри визначення аристоксієвої кислоти І представлені у табл. 2.

Результати виражаються як середні значення трьох вимірювань \pm SD.

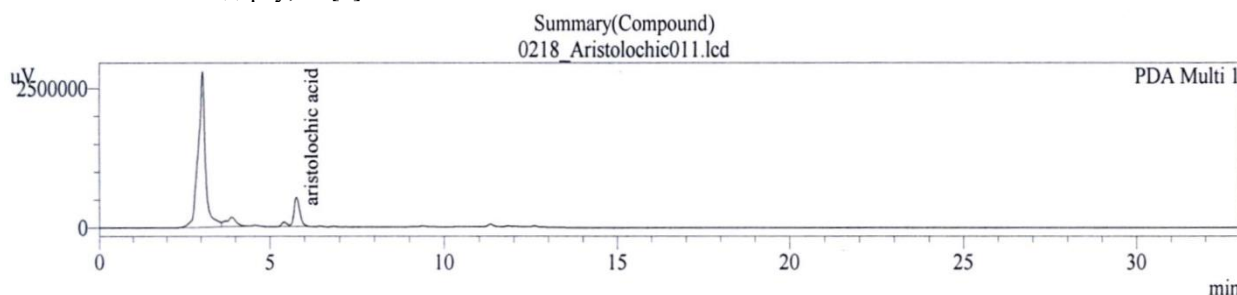


Рис. 3. Хроматограма виявлення аристоксієвої кислоти І у густому екстракті з трави хвилівнику звичайного

Таблиця 2. Хроматографічні параметри для визначення аристоксієвої кислоти І у густому екстракті з трави хвилівнику звичайного

Сполука	Час утримування, хв	Площа	Коефіцієнт симетрії	Число теоретичних тарілок	Коефіцієнт розділення
Аристоксієва кислота І	5,766 \pm 0,018	6173623 \pm 290362	1,233 \pm 0,0926	5536,115 \pm 547,7115	1,152 \pm 0,1139

У ході проведення аналізу в одержаному екстракті було ідентифіковано аристоксієву кислоту І (час утримування – 5,766 \pm 0,018 хв). Час утримування стандартного зразка аристоксієвої кислоти І – 5,847 \pm 0,022 хв.

Вміст аристоксієвої кислоти І у досліджуваному екстракті становив 0,39 \pm 0,01 %.

У результаті визначення цитотоксичної активності густого екстракту з трави хвилівнику звичайного встановлено, що найвиразніші показники цитотоксичного впливу були зареєстровані в дозі 15–60 мг/мл після інкубації протягом 24 годин. На фоні доз 60 мг/мл відмічений практично 98%-вий цитотоксичний ефект. LC₅₀ була зареєстрована на тлі дози 7,5 мг/мл після інкубування з клітинами ВНК-21 протягом 24

годин. На фоні доз 3,75 мг/мл та 1,85 мг/мл зареєстрована приблизно однакова кількість клітин, які вижили, яка складала 75,0% та 74,88% відповідно. В експозиції 48 годин під впливом екстракту відзначено підвищення цитотоксичної дії.

Висновки. У результаті проведеного дослідження у густому екстракті з трави хвилівнику звичайного ідентифіковано аристолохієву кислоту I, а також визначено її кількісний вміст, який становив 0,39 %. За допомогою фотокolorиметричного методу було встановлено цитотоксичну дію досліджуваного густого екстракту з трави хвилівнику звичайного на клітині ВНК-21. Визначення ступеня проліферації клітин ВНК-21 у тесті з генціанфіолетом показало, що здатність до проліферації в присутності досліджуваного екстракту носила дозо- і час-залежний характер. Таким чином, отримані дані можуть бути використані при стандартизації густого екстракту з трави хвилівнику звичайного, а також при розробці та одержанні нових лікарських засобів на основі одержаного екстракту.

Determination of aristolochic acid I in a thick extract of *Aristolochia clematitis* herb by HPLC and the establishment of its cytotoxic activity Pohodina L.I., Burda N.Ye.

Introduction. *Aristolochia clematitis* L. is a perennial herbaceous plant with a short rhizome and a characteristic odor. In different countries of the world, including Ukraine, this plant is grown as an ornamental or can be found as a weed. The chemical composition of raw materials of *Aristolochia clematitis* is represented by different classes of biologically active substances, in particular aristolochic acids. Aristolochic acid I is the most common aristolochic acid, found in almost all species of the genus *Aristolochia*, in particular in *Aristolochia clematitis*. It is known that the raw material of *Aristolochia clematitis* is toxic, in particular due to the content of aristolochic acids. Studies by various scientists have shown that aristolochic acids can cause nephropathy and inhibit DNA synthesis in hepatoma HepG2 cells in a dose-dependent manner. Therefore, continuing research on the prospects for the use of raw materials of this plant in medicine, we obtained a thick extract of *Aristolochia clematitis* herb. **The aim of the study** was to determine aristolochic acid I in a thick extract of *Aristolochia clematitis* herb and to determine its cytotoxic activity. **Materials and methods.** For the study, a thick extract obtained from *Aristolochia clematitis* herb, harvested during the flowering period, was used. The technology of obtaining a thick extract from *Aristolochia clematitis* herb is as follows: a portion of the crushed raw material into powder was placed in a conical flask and added as an extractant 70% ethanol. First infused for 1 hour at room temperature, then heated under reflux for 2 hours at 60 ° C. The resulting extract was then cooled, filtered and dried to obtain a thick extract. Chromatographic study of a thick extract of *Aristolochia clematitis* herb was performed on a liquid chromatograph equipped with a diode array detector Shimadzu HPLC-system, ser.20 under the following conditions:

- Xterra MS C18 speaker, size 150 mm x 4.6 mm,

particle size 3.5 μm;

- column temperature - 400°C;
- detection wavelength - 390 nm;
- flow rate of the mobile phase - 0.3 ml / min;
- volume of the entered sample - 25 μl;
- mobile phase is reduced

Chromatography time, min	Eluent A, ¹ %	Eluent B, ² %
0– 25	85 → 35	15 → 65
25–30	35 → 0	65 → 100
30–31	0 → 85	100 → 15

¹ Eluent A: 0.1% aqueous solution of trifluoroacetic acid.

² Eluent B: 0.1% solution of acetonitrile in trifluoroacetic acid.

Solvent mixture: acetonitrile - water (50:50).

Solution of comparison: a portion of a standard sample of aristolochic acid I 1 mg was dissolved in a mixture of solvents and brought to the mark with the same solvent. 1 ml of the resulting solution was transferred into a 10 ml flask and adjusted to the mark with a mixture of solvents. The solution was filtered through a 0.45 μm filter.

Determination of cytotoxic activity was performed on an *in vitro* model at the National University of Pharmacy, on the basis of the problem laboratory of morphofunctional research, under the guidance of Dr. Biol.N., Professor Maloshtan L.M. The study used a line of transplanted animal cell cultures BHK -21 (Baby Hamster Kidney) - a culture of fibroblast-like cells of the kidney of a newborn Syrian hamster. Cytotoxic effects were assessed by reducing cell proliferation in the gentian violet assay.

Research results. During the analysis, aristolochic acid I was identified in the obtained extract (retention time - 5,766 ± 0,018 min). The retention time of the standard sample of aristolochic acid I - 5,847 ± 0,022 minutes. The content of aristolochic acid I in the studied extract was 0.39 ± 0.01%. As a result of determining the cytotoxic activity of a thick extract of *Aristolochia clematitis* herb, it was found that the most pronounced indicators of cytotoxic effects were recorded at a dose of 15–60 mg / ml after incubation for 24 hours. Against the background of doses of 60 mg / ml, almost 98% cytotoxic effect was observed. LC₅₀ was recorded at a dose of 7.5 mg / ml after incubation with BHK-21 cells for 24 hours. Against the background of doses of 3.75 mg / ml and 1.85 mg / ml, approximately the same number of surviving cells was registered, which was 75.0% and 74.88%, respectively. An increase in cytotoxic effects was observed in the 48-hour exposure under the influence of the extract. **Conclusions.** As a result of the study, aristolochic acid I was identified in a thick extract of *Aristolochia clematitis* herb, and its quantitative content was determined, which was 0.39%. Using the photocolormetric method, the cytotoxic effect of the investigated thick extract of *Aristolochia clematitis* herb on BHK-21 cells was established. Determination of the degree of proliferation of BHK-21 cells in the gentian violet test showed that the ability to proliferate in the presence of the studied extract was dose- and time-dependent. Thus, the obtained data can be used in the standardization of a thick extract of *Aristolochia clematitis* herb, as well as in the development and production of new drugs based on the obtained extract.

Keywords: *Aristolochia clematitis*, aristolochic acid I, HPLC, cytotoxic activity.

References

1. Ping-Chung Kuo, Yue-Chiun Li, Tian-Shung Wu(Dr.). Chemical Constituents and Pharmacology of the *Aristolochia* species. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2012. Vol. 2, Issue 4. P. 249-266. [https://doi.org/10.1016/S2225-4110\(16\)30111-0](https://doi.org/10.1016/S2225-4110(16)30111-0)
2. Pohodina L, Burda N, Kyslychenko V et al. Aristolochic acid I determination in *Aristolochia clematitis* L. raw materials by HPLC method. *Bull. Pharm. Sci., Assiut University*. 2020. Vol. 43, Issue 2. P. 149-155. DOI: 10.21608/BFSA.2020.127407
3. Estelle N H Youla, Cécile Husson, Charaf El Khattabi et al. Characterization of cytotoxic effects of aristolochic acids on the vascular endothelium. *Toxicology in Vitro*. 2020. Vol. 65. 104811. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104811>
4. Hong-Jian Ji, Jia-Yuan Li, Shi-Fei Wu et al. Two New Aristolochic Acid Analogues from the Roots of *Aristolochia contorta* with Significant Cytotoxic Activity. *Molecules*. 2020. Vol. 23. Vol. 26 (1). P. 44. doi: 10.3390/molecules26010044.
5. Dana Nitzsche, Matthias F Melzig, Volker M Arlt. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of aristolochic acid I - a component of Aristolochiaceae plant extracts used in homeopathy. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013. Vol. 35 (2). P. 325-334. DOI: 10.1016/j.etap.2013.01.007
6. Shatalova O, Malochtan L, Pohodina L et al. Study of cytotoxic activity of extracts of the *Aristolohia clematitis* L. *Norwegian Journal of development of the International Science*. 2021. № 53/2021. P. 24-27. DOI: 10.24412/3453-9875-2021-53-1-24-27
7. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016. Vol. (4). P. 343-347. DOI: 10.1101/pdb.prot087379