

Activitatea antiradicalică a glicozidelor steroidice izolate din *Asparagus officinalis* L

Gh. Goreanu¹, V. Bobeică², P. Chintea³, N. Mașcenco³, R. Ivanova³

¹ Catedra Farmacognozie și Botanică Farmaceutică, USMF „Nicolae Testemițanu”

² Catedra Chimie Industrială și Ecologică, USM

³ Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor, AȘM

The Antiradical Activity of the Steroidal Glycosides Isolated from *Asparagus Officinalis* L.

This work describes the results of the research *in vitro* of antiradical/antioxidant properties of the extractive preparation of steroidal (spirostanolic and furostanolic) glycosides (saponins) isolated from the rootstocks and roots of sparrowgrass (*Asparagus officinalis* L.). Tests using the potentiometrical titration method show the capacity of these substances to absorb peroxide radicals in reactive mixture generating peroxide radicals. Antiradical activity of individual furostanolic glycoside Asparagocide H represents the linear dependence of the concentration between 2,5 – 5,8 mg/ml when the maximal radical absorption is reached (68.49%). At the same time the index IC₅₀ of Asparagocide H is 4.30 mg/ml. But the same indices for the saponins preparation are about five times less: the maximal absorption (90.62%) of radicals is obtained in a concentration of 1.1mg/ml and when the index IC₅₀ is 0.78mg/ml.

Key words: asparagocide, steroidal glycosides, *Asparagus officinalis* L., antiradical activity.

Антирадикальная активность стероидных гликозидов, выделенных из *Asparagus officinalis* L

В работе представлены результаты исследования *in vitro* антирадикальных/антиокислительных свойств сухого суммарного экстрактивного препарата стероидных (спиростанолевых и фураностанолевых) гликозидов (сапонинов), выделенных из корневищ и корней спаржи лекарственной (*Asparagus officinalis* L.). С помощью метода потенциометрического титрования определена способность испытуемых веществ абсорбировать кислородные радикалы в реакционной смеси, генерирующей пероксидные радикалы. Установлено, что антирадикальная активность индивидуального фураностанолового гликозида аспарагозида H является линейной зависимостью от концентрации в пределах от 2,5 до 5,8 мг/мл, когда достигается максимальная абсорбция (68,49%) радикалов. При этом индекс IC₅₀ аспарагозида H составляет 4,30 мг/мл. Эти же показатели для суммарного сапонинового препарата из корневищ и корней спаржи лекарственной являются примерно в пять раз меньше: максимальная абсорбция (90,62%) радикалов достигается при концентрации 1,1 мг/мл, а индекс IC₅₀ составляет 0,78 мг/мл.

Ключевые слова: аспарагозид, стероидные гликозиды, спаржа лекарственная, антирадикальная активность.

Introducere

Diferite specii de plante medicinale conțin diverse substanțe farmacologic active, inclusiv bioantioxidanți care, în organismul uman, contribuie la menținerea potențialului antioxidant – una dintre condițiile activității fiziologice normale a organismului. Bioantioxidanții sunt înalt apreciați în calitate de principii active, sau de componente însoțitoare, ale preparatelor farmaceutice și ale produselor alimentare. Compușii chimici naturali, cu cele mai pronunțate proprietăți antioxidative, sunt acidul ascorbic, tocoferolii, carotenoidele, unii flavonoli etc. Cercetările consacrate identificării de noi bioantioxidanți din surse vegetale continuă [1]. În cadrul studiilor privind identificarea de noi compuși naturali cu un asemenea tip de activitate și de noi surse de un asemenea tip de compuși, s-au întreprins și anumite cercetări privind proprietățile antioxidante ale unor saponine [2]. În special, s-a stabilit că glicozidele steroidice posedă o anumită activitate antioxidantă, iar glicozidele furostanolice sunt cu 30-50% mai active față de analogii lor spirostanolici. Astfel, asparagozida G, triozidă furostanolică, izolată din produsul „rizomi și rădăcini de *Asparagus officinalis* L” în experimentele descrise, manifestă o activitate antiradicalică cu 45-50% mai mare față de asparagozida D – analogul său spirostanolic [2]. Drept urmare a acestei concluzii, asparagozida H, glicozidă

furostanolică, tetraozidă, din aceeași serie cu asparagozida G și care se conține în cea mai mare cantitate în rizomii și în rădăcinile de *Asparagus officinalis* L [3], a fost studiată ca un posibil element componistic al mediului crioprotector de prevenire a peroxidării lipidice a spermei de la animale în procesul de crioconservare. Adaosul de asparagozidă H în mediul crioprotector, în concentrația optimă, determinată experimental, a mărit indicele absolut de supraviețuire, longevitatea și mobilitatea gameților spermei de taur după decongelare [4].

Dat fiind faptul că obținerea unei glicozide furostanolice individuale este o procedură greu de realizat, care necesită cantități mari de solvenți și de materiale, se impune cercetarea unor extracte semipurificate îmbogățite cu saponine steroidice. O asemenea abordare a servit drept premisă în stabilirea de scop al prezentei lucrări.

Scopul prezentei cercetări este obținerea de noi date privind activitatea antiradicalică a glicozidelor steroidice în baza determinării acestei activități a preparatului extractiv de glicozide steroidice din rizomii și din rădăcinile de sparangel medicinal (*Asparagus officinalis* L).

Materiale și metode

Pentru obținerea de noi date privind activitatea antiradicală a saponinelor steroidice, în calitate de substanță

test a fost utilizat preparatul extractiv pe baza totalului de glicozide steroidice (furostanolice și spirostanolice), obținut din rizomii și din rădăcinile de sparangel medicinal (*Asparagus officinalis* L). Preparatul reprezintă un praf de culoare cafe-niu-deschisă (umiditatea – 5%, reziduul de cenușă – 5%), cu un conținut total de circa 80% de saponine (50% – glicozide furostanolice și 25-30% – glicozide spirostanolice) și 20-25% de substanțe însoțitoare. Preparatul a fost obținut prin extragerea din rizomii și din rădăcinile de *Asparagus officinalis* L cu alcool etilic de 70%, precipitare, după înlăturarea alcoolului prin distilare, din reziduul apos cu acetona și purificarea cromatografică pe coloane cu Silicagel și cu sisteme de solvenți acceptate, pentru separarea cromatografică a saponinelor steroidice.

Totalul saponinelor prezintă suma glicozidelor spirostanolice și furostanolice ale sarsapogenolului [(25S)-5 β -spirostan-3 α -ol] și a analogului său furostanolic [(25S)-5 β -furostan-3 α , 22 α , 26-triol], descrise anterior [5].

În calitate de substanță standard a fost utilizată glicozida furostanolică individuală asparagozida H, izolată din preparatul sumar examinat și care este: $\rightarrow 3-O-[-\beta-D-xilopiranozil(1 \rightarrow 4)\beta-D-glucopiranozil(1 \rightarrow 4)]-[-\beta-D-glucopiranozil(1 \rightarrow 3)]-\beta-D-glucopiranozil-1-26-O-[-\beta-D-glucopiranozil-(25S)-5\beta-furostan-3\beta, 22\alpha, 26-triol]$ [3].

Activitatea antiradicalică s-a determinat prin metoda titrării potențimetrice de determinare *in vitro* a capacității antioxidante (capacitatea de captare a radicalilor de oxigen) ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity), descrisă și aplicată de Sano și de coautori pentru determinarea activității antiradicalice a flavonoizilor și a extractelor vegetale [6], în modificarea Ivanova [7].

Metoda se bazează pe generarea radicalilor liberi peroxi (ROO) cu ajutorul 2,2 – azobis (2-amidinopropan) dihidrocloridului. Activitatea antiradicală (ARA, %) s-a determinat față de proba de control, care nu conține bioantioxidanți. Concentrația, la care bioantioxidantul manifestă efectul de captare a 50% din radicalii liberi (IC₅₀ – Inhibitory Concentration), s-a calculat din relația doză-dependență.

Aparataj. Titratorul potențimetric *TitroLine Easy* (Shott, Germania), dozatorul electronic *Arise model A 1000-1*, termostat universal.

Rezultate și discuții

Selectarea în calitate de obiect de studiu a totalului de saponine steroido-glicozidice din rizomii și din rădăcinile de *Asparagus officinalis* L a fost determinată de câteva raționalmente de ordin teoretic și practic, care rezultă din informația acumulată până în prezent. Cercetările din acest domeniu [2, 4], deși puține, pun în evidență două tendințe ale dependenței structură-activitate pentru acest caz:

- glicozidele furostanolice sunt mai active decât cele spirostanolice;
- activitatea antioxidantă este mai mare la glicozidele cu mai multe grupuri hidroxil în aglicon.

Conținutul saponinic al produsului vegetal *rizomi și rădăcini de sparangel medicinal* se înscrie foarte bine în aceste tendințe. Cota compușilor furostanolici în totalul glicozidic este de circa patru ori mai mare decât cea a spirostanolilor. Aglicoanele glicozidelor din rizomii și din rădăcinile de *Asparagus officinalis* L conțin două (în cazul spirostanolilor) și trei (în cazul furostanolilor) grupuri hidroxil, în timp ce majoritatea glicozidelor steroidice cunoscute conțin unul și două grupuri hidroxil, respectiv, pentru spirostanoli și furostanoli.

În aspect practic, selectarea obiectului în cauză a fost favorizată de conținutul mare (18%) de saponine în respectivul produs vegetal și posibilitatea obținerii unui preparat extractiv sec, cu un conținut mare (circa 80%) de saponine prin metode accesibile și cu cost relativ mic.

Metoda potențimetrică de determinare a activității antiradicalice a fost selectată ca fiind, în opinia noastră, cea mai accesibilă și mai apropiată de scopul cercetării noastre. La ora actuală nu există o metodă standard acceptată pentru determinarea activității antiradicalice a bioantioxidanților. Diferite substanțe naturale, din diferite clase de compuși chimici, au fost testate la activitatea antiradicală prin metode diferite care se bazează pe diferite reacții și mecanisme chimice, fapt care face aproape imposibilă compararea activității antiradicalice a mai multor substanțe după datele din literatură. Astfel, activitatea antioxidantă a mai multor saponine steroidice individuale și saponine, inclusiv a asparagozidelor spirostanolice C și D, asparagozidei furostanolice G și a agliconului sarsapogenolului, a fost determinată prin metoda titrării

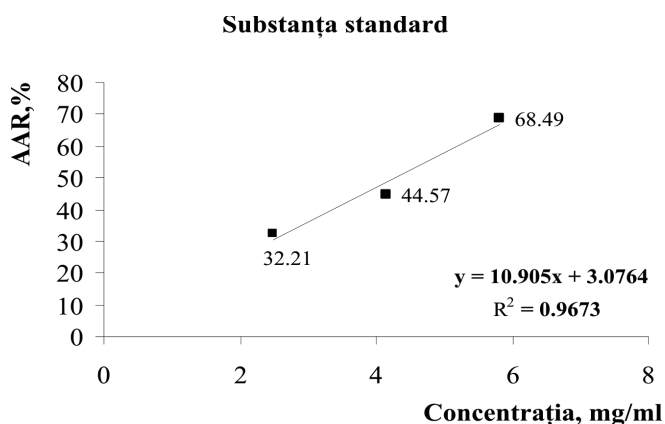


Fig. 1. Dependența activității antiradicalice a substanței – standard, asparagozida H, de concentrație.

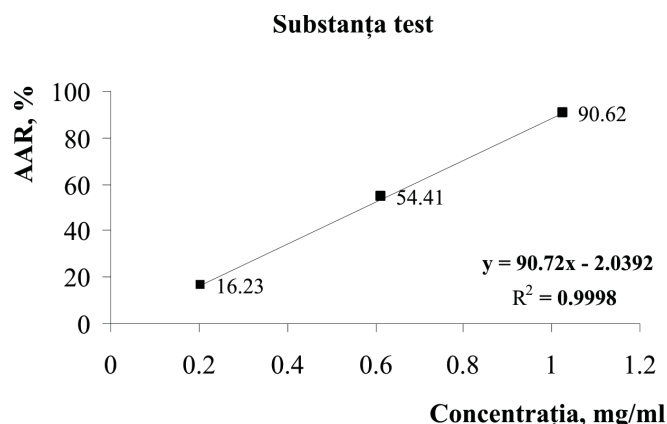


Fig. 2. Dependența activității antiradicalice a substanței – test, preparatul extractiv saponinic, de concentrație.

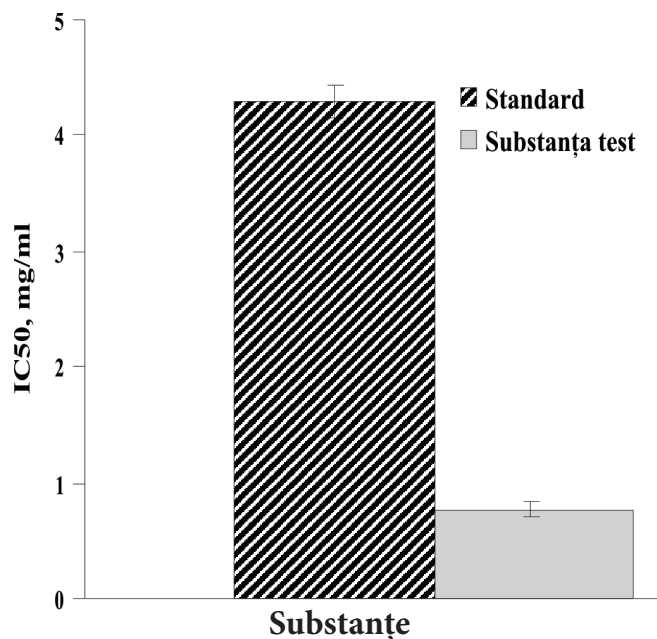


Fig. 3. Concentrația inhibitoare pentru 50% din radicalii liberi – IC₅₀ a substanțelor cercetate.

iodometrică a peroxizilor formați la oxidarea metileoleatului cu oxigen din aer în prezența și în lipsa substanței testate, în condițiile standard ale metodei [2].

Metoda ORAC nu necesită aparatură sofisticată, are o reproductibilitate bună în condițiile unui diapazon al valorilor pH-ului (4,5-6,0) acceptabil pentru sistemele biologice, a fost aplicată cu succes pentru determinarea activității antiradicale a mai multor substanțe și extracte vegetale.

S-a evidențiat că activitatea antiradicale a substanțelor cercetate este liniar dependentă de concentrația cu aproximație înaltă ($r^2=0,9673-0,9998$) în diapazonul 2,5-5,8 mg/ml și 0,2-1,1 mg/ml, respectiv pentru standard (fig. 1) și substanța – test (fig. 2) S-a calculat indicele IC₅₀ – concentrația inhibitoare pentru 50% din radicalii liberi. IC₅₀ a substanței – standard este egal cu 4,30±0,14 mg/ml. În comparație cu standardul, substanța – test a manifestat activitatea antiradicale de 5,5 ori mai mare, IC₅₀ = 0,78±0,01 mg/ml (fig. 3).

Rezultatele obținute, prin valoarea lor cantitativă, demonstrează univoc activitatea antiradicale net superioară a totalului saponinic parțial purificat față de glicozida individuală (substanța – standard) asparagozida H. Pornind de la faptul că această glicozidă este cantitativ dominantă în totalul glicozidic al preparatului extractiv examinat, se pot presupune mai multe cauze ale acestui efect impunător. O cauză ar putea fi efectul sinergic al tuturor saponinelor

– furostanolice și spirostanolice. Altă cauză ar putea fi rolul substanțelor însoțitoare care formează 25-30% din preparat. Nu este de neglijat nici varianta existenței în preparat a unui alt compus, nesteroidic, cu o activitate antiradicale mult mai pronunțată decât cea a saponinelor steroidice. Trebuie de luat în calcul și faptul că printre substanțele însoțitoare sunt și flavonoizii, mulți reprezentanți ai acestora, de asemenea, fiind caracterizați ca antioxidanți. Aceste raționalmente, sugerate de rezultatele experimentale obținute, impulsionează noi cercetări experimentale privind izolarea mai multor componente chimice din preparatul studiat și stabilirea activității antiradicale a acestora.

Concluzie

Activitatea antiradicale a preparatului extractiv saponinic sec din rizomii și din rădăcinile de *Asparagus officinalis* L, cu un conținut de 50% de glicozide furostanolice și de 25-30% de glicozide spirostanolice ale sarsapogenolului și ale analogului său furostanolic, este de peste cinci ori mai mare față de activitatea antiradicale a glicozidei individuale asparagozida H, care domină cantitativ în totalul glicozidic.

Bibliografie

1. Betancor-Fernandez A., Peres-Galvez A., Sies H., Stahi W. Screening pharmaceutical preparations containing extracts of turmeric rhizome, artichoke leaf, devils claw root and garlic or salmon oil for antioxidant capacity. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2003; Vol. 55, N.7, p. 981-986.
2. Кинтя П. К., Бурцева С. А., Ковальчук Л. П., Машенко Н. Е., Бобейко В. А. Поиск антиоксидантов в ряду стероидных гликозидов. *Хим. фарм. ж.*; 1982, № 1, с. 95-97.
3. Горяну Г. М., Кинтя П. К. Стероидные гликозиды из *Asparagus officinalis*. *Аспарагозиды F и H. ХПС*; 1977, № 6, с. 810-813.
4. Goreanu G. Proprietatea antioxidativă a asparagozidei H din *Asparagus officinalis* L. *Curier medical*, 2002, Nr. 1, p. 25-27.
5. Лазурьевский Г. В., Горяну Г. М., Кинтя П. К. Стероидные гликозиды из *Asparagus officinalis*. *Докл. АН СССР*; 1976, Т. 231, № 6, с. 1479-1471.
6. Sano M., Yoshida R., Degawa M., Miyase T., Yoshino K. Determination of peroxyl radical scavenging activity of flavonoids and plant extracts using an automatic potentiometric titrator. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, Vol. 51, N. 10, p. 2912-2916.
7. Ivanova R. Evaluarea activității antiradicale *in vitro* a bioantioxidanților prin metoda potențiometrică. *Materialele conferinței științifico-practice «Ziua medicamentului la INF. Medicamentul de la idee la farmacie»*. Chișinău, 2004, p. 76-81.

Gheorghe Goreanu, dr., conferențiar

Catedra Farmacognozie și Botanica farmaceutică

USMF „Nicolae Testemițanu”

Chișinău, MD-2025, str. Malina Mică, 66

Tel.: 727414

Recepționat 06.05.2009