

## ZINC DETERMINATION IN EXTRACTS FROM BACOPA MONNIERI SHOOT CULTURES INTO SIMULATED GASTRIC FLUIDS

(oryg. Oznaczenie cynku w ekstraktach biomasy z kultur pędowych *Bacopa monnieri* do sztucznych soków trawiennych)

Bożena MUSZYŃSKA<sup>1</sup>, Jacek ROJOWSKI<sup>2</sup>, Maciej ŁOJEWSKI<sup>1</sup>, Karolina DZIWULSKA<sup>2</sup>,  
Włodzimierz OPOKA<sup>2</sup>

<sup>1.</sup> Department of Pharmaceutical Botany, Jagiellonian University Collegium Medicum, Medyczna 9, 30-688 Kraków, Poland

<sup>2.</sup> Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Jagiellonian University Collegium Medicum, Medyczna 9, 30-688 Kraków, Poland

### Abstract

*Bacopa monnieri* (Water hyssop) is a hydrophyte occurring in Asia and the southern US states. This plant is known in India as Brahmi and has been used in Ayurvedic medicine for 5,000 years as sedative, supporting the treatment of insomnia and improving cerebral circulation. For the biological effect in this species are responsible triterpenoids saponins – bacosides. The aim of the study was to obtain the biomass of *B. monnieri* shoot in vitro cultures, and then evaluating the biomass growth and content of zinc. *B. monnieri* derived from in vitro culture on Murashige-Skoog medium (MS) and on the same medium, but enriched in organic additives and elements may be a good source of Zinc for the human body. The experiment was also conducted on the commercial formulations containing *B. monnieri*. For the determination of zinc ions DP ASV method was used. It was found that the use of highly mineralized water (mineral water “Stefan” – Spa Szczawnica) for extraction of *B. monnieri* biomass from in vitro culture provided the highest concentration of zinc in the material and for the biomass from MS medium with the addition of As (163.52, and 167.23 mg/mL, respectively). The lowest content was found in *B. monnieri* biomass from MS medium supplemented with serine, and the capsules product (13.54 and 14.57 mg/mL). For extracts of *B. monnieri* biomass from MS medium enriched with Zn salts into digestive juices the highest concentration of zinc was determined in gastric juice (6.88 mg/mL).

**Keywords:** *Bacopa monnieri*, DP-ASV method, in vitro culture, zinc.

**Corresponding author:** Bożena Muszyńska, muchon@poczta.fm

### Wstęp

*Bacopa monnieri* (Herpestismoniera – hyzop wodny) to hydrofit występujący w Indiach, Chinach, Nepalu, Wietnamie, na Tajwanie, Florydzie, i w innych południowych stanach USA [1-3]. Roślina ta znana jest w Indiach pod nazwą Brahmi lub Jalanimba [Fot.1]. W stanie naturalnym jest obecnie pod ochroną.

Jest surowcem wykorzystywanym przede wszystkim w medycynie ajurwedyjskiej, zaś sama nazwa Brahmi wywodzi się od imienia hinduskiego Boga. W Indiach jest stosowana już od 5000 lat jako surowiec o działaniu uspokajającym, wspomagającym leczenie bezsenności oraz polepszającym koncentrację [4-6]. Za działanie biologiczne w tym gatunku odpowiedzialne są: saponiny triterpenowe: bakozyd A i B, bako-saponiny (A, B, C, D, G), bakopazydy (A, B, C)

monnieryzydy I-III oraz plantainozyd B. Ponadto w surowcu występują alkaloidy – herpestyna i bramina, alkoholocukry, związki fenolowe, flawonoidy – luteolina i apigenina, kwas betulinowy, fitosterole – stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, stigmastanol. Dzięki tym substancjom ekstrakty i preparaty z tej rośliny mają wielokierunkowe działanie lecznicze [7]. Stosowane są do poprawy pamięci, polepszenia funkcji poznawczych oraz w leczeniu niektórych chorób neurologicznych [8]. Za działanie przeciwstarzeniowe i nootropowe, odpowiadają wymienione wcześniej bakozydy, które zwiększają syntezę acetylocholin i modulują metabolizm neuroprzebieżników monoaminergicznych i hamują peroksydację lipidów w mózgu [3,5]. *B. monnieri* wykazuje działanie neuroochronne, ponieważ ma zdolność do



Fot. 1. *Bacopa monnieri*

chelatawania jonów metali, neutralizacji wolnych rodników oraz aktywacji enzymów antyoksydacyjnych [9,10]. Wykazuje też właściwości przeciwdepresyjne i przeciwdrgawkowe, nie dając przy tym efektów niepożądanych takich jak ból głowy czy zaburzenia rytmu serca. Działanie to polega na aktywowaniu receptorów GABA, blokowaniu kanałów sodowych, dzięki czemu stabilizowane są błony komórkowe neuronów [12,13,14]. Etanolowy ekstrakt z tego surowca działa ochronnie na wątrobę poprzez obniżenie poziomu enzymów ASPAT i ALAT [5]. Stwierdzono działanie przeciwnowotworowe ekstraktów etanolowych *B. monnieri* na liniach komórkowych Walker carcinoma 256 i sarkoma 180 [6,15].

Celem pracy było pozyskanie kultur *in vitro* *B. monnieri*, a z nich powtarzalnej biomasy. Następnie określenie czy biomasa *B. monnieri* otrzymana z kultur *in vitro* na podłożu Murashiga-Skooga oraz na tym samym podłożu, ale wzbogaconym w dodatki organiczne i pierwiastki, może być dobrym źródłem cynku dla organizmu człowieka. W tym celu próbki uzyskanej biomasy poddano procesowi mineralizacji w piecu mufowym i oznaczono w nich cynk stosując elektrochemiczną metodę anodowej woltamperometrii strippingowej. W następnym etapie badań przeprowadzono ekstrakcję biomasy *B. monnieri* w różnych przedziałach czasowych do sztucznego soku żołądkowego oraz jelitowego. W aktualnym eksperymencie zawartość cynku oraz jego ilość po ekstrakcji do sztucznych soków trawiennych oznaczono także w preparacie *B. monnieri* komercyjnego pochodzenia. W tym

celu otrzymane ekstrakty poddano mineralizacji z wykorzystaniem promieniowania UV, a następnie oznaczono w nich cynk stosując metodę anodowej woltamperometrii strippingowej, która została zwalidowana przy użyciu materiału certyfikowanego (liście herbaty INCT TL 1, materiał certyfikowany).

## Materiały i metody

### Materiał roślinny

Materiał do badań stanowiły pędowe kultury *in vitro* *Bacopa monnieri*, należącej do rodziny *Plantaginaceae* – Bąbkowate. Badania przeprowadzono na uzyskanych pędach z kultur *B. monnieri*. Wyjściowy materiał do kultur eksperymentalnych pozyskano z firmy IVPLANT (kultury *in vitro*). Pocięte na centymetrowe kawałki pędy umieszczono w kolbach Erlenmeyera i pasażowano na płynną pożywkę według Murashige i Skoog (MS) [16] z kwasem nikotynowym, mio-inozytolem i witaminą B<sub>1</sub> (4,0 mL/L) oraz z regulatorami wzrostu: benzyloaminopuryną (BAP) 1,0 mg/L i kwasem naftalenoctowym (NAA) 0,2 mg/L. Kultury pędowe *in vitro* *B. monnieri* były pasażowane co cztery tygodnie [Fot.2].

### Eksperymentalne kultury *in vitro* *Bacopa monnieri*

Pędy z podstawowej pożywki zostały uzyskane, jako materiał wyjściowy do wyprowadzenia kultur na zmodyfikowanych pożywkach. Modyfikacje polegały na dodaniu do podstawowej pożywki odpowiednio: siarczanu(VI) magnezu, wodorosparagianianu cynku, L-tryptofanu, seryny i kwasu antranilowego w różnych stężeniach. Użyto również dodatku do podłoża arsenu ze względu na to, że w warunkach naturalnego występowania rośliny (Azja) wody są skażone arsenem.

Zastosowano następujące warianty kultur *in vitro* *B. monnieri*:

- Biomasa *B. monnieri* uzyskana na podłożu MS wzbogaconym w 0,1 mg/L wodorosparagianianu cynku
- Biomasa *B. monnieri* uzyskana na podłożu MS wzbogaconym w 1,0 mg/L seryny
- Biomasa *B. monnieri* uzyskana na podłożu MS wzbogaconym w 1,0 mg/L kwasu antranilowego
- Biomasa *B. monnieri* uzyskana na podłożu MS wzbogaconym 50 µg/L As

- Biomasa *B. monnieri* uzyskana na podłożu MS wzbogaconym w 400 µg/L As
- Biomasa *B. monnieri* uzyskana na podłożu MS wzbogaconym 500 µg/L As

W eksperymencie wykorzystano też *B. monnieri* kapsułki – Swanson full spectrum *B. monnieri* 500 mg (90 kaps. Nr serii B 210694) oraz w celu



Fot. 2. *Bacopa monnieri* *in vitro* culture on Murashige-Skoog medium

walidacji metody oznaczania cynku: liście herbaty INCT TL 1, materiał certyfikowany.

Wszystkie eksperymentalne kultury *in vitro* prowadzono przy stałym, sztucznym oświetleniu (4 W/m<sup>2</sup>, LF-40W lampy, światło dzienne, producent Piła) w temperaturze 25 ± 2°C. Część hodowli wytrząsano z szybkością 140 obrotów na minutę (wytrząsarka Altel, Polska), a część prowadzono stacjonarnie. Co cztery tygodnie zbierano świeżą biomasa, którą następnie mrożono i liofilizowano (Liofilizator Freezone 4.5, Labconco; temp.: -40°C). Po liofilizacji materiał sproszkowano w moździerzu agatowym i użyto do analizy na zawartość cynku.

### Odczynniki

Do przeprowadzenia badań omówionych w pracy wykorzystano następujące odczynniki: Azotan(V) potasu Merck Suprapur®; stężony kwas azotowy(V) Merck Suprapur®; perhydrol, Merck Suprapur®, wzorzec cynku 1000 ppm OUM-7 Łódź; woda czterokrotnie destylowana o przewodności poniżej 1 µS×cm<sup>-1</sup> pochodząca z aparatu do destylacji S2-97A (Chemlann); elektrolit podstawowy, otrzymany przez zmieszanie 4,75 mL wody czterokrotnie destylowanej z 0,25 mL roztworu KNO<sub>3</sub> o stężeniu 2 mol/L.

### Przygotowanie sztucznych soków trawiennych:

#### Sok żołądkowy

Przygotowano przez odważenie 2 g NaCl i 3,2 g pepsyny, następnie dodanie 80 mL HCl o stężeniu 1 mol/L. Następnie składniki umieszczono w kolbie i uzupełniono wodą czterokrotnie destylowaną do objętości 1000 mL [17].

#### Sok jelitowy

W celu jego przygotowania odważono 0,02 g ekstraktu trzustkowego; 0,125 g soli żółciowych; 8,4 g NaHCO<sub>3</sub> i umieszczono w kolbie. Następnie uzupełniono wodą czterokrotnie destylowaną do objętości 1000 mL [18].

#### Aparatura

Do oznaczenia zawartości cynku w próbkach wykorzystano stanowisko pomiarowe składające się z analizatora elektrochemicznego M161 (MTM anko) i statywu elektrodowego M164 (MTM anko), który zawiera elektrodę rtęciową o kontrolowanym wroście kropli (CGMDE). Mineralizację próbek w celu oznaczenia w nich jonów cynku przeprowadzono w piecu muflowym. Uwalnianie jonów cynku do sztucznych soków trawiennych z badanego materiału przeprowadzono w prototypowym aparacie przepływowym, skonstruowanym w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM. Próbki otrzymane w wyniku przepuszczenia sztucznych soków trawiennych przez badany materiał poddano mineralizacji mokrej kwasem azotowym(V) z dodatkiem perhydrolu oraz przy użyciu lampy UV (Mineral, Polska).

#### Sposób przygotowania próbek

Z każdego rodzaju badanego materiału sporządzono naważki po 500 mg i umieszczono w tyglu. Tygle zawierające naważki umieszczono w piecu muflowym, w temperaturze 400°C na czas trzech dni w celu usunięcia matrycy organicznej. Tak wyprażony materiał zadano 500 µL kwasu azotowego(V), ustawiono na płycie grzewczej i odparowano do sucha. Po odparowaniu dodawano porcjami wodę czterokrotnie destylowaną w celu ilościowego przeniesienia analitu do kolby miarowej (klasa A) do objętości 5 mL. W tak przygotowanych próbkach badano zawartość jonów cynku.

W celu oznaczenia cynku uwolnionego do sztucznych soków trawiennych sporządzono naważki z materiału badanego o znanej masie i umieszczono w aparacie przepływowym. Po przeprowadzeniu cyklu uwalniania (30 minut

dla soku żołądkowego i 90 minut dla soku jelitowego) pobrano 5 mL soku żołądkowego i 5 mL soku jelitowego, przeniesiono do naczyń kwarcowych, dodano 500 µL kwasu azotowego(V) i 50 µL perhydrolu, a następnie umieszczono w mineralizatorze UV na 48 h. Po tym czasie zawartość naczyń przelano do kwarcowych parowniczek i odparowano do prawie sucha na płycie grzewczej. Dodawano porcjami wodę czterokrotnie destylowaną w celu przeniesienia ilościowego do kolb miarowych klasy A do objętości 5 mL. W tak przygotowanych próbkach wykonano oznaczenia zawartości jonów cynku.

#### Sposób przeprowadzenia pomiarów

Oznaczenia jonów cynku przeprowadzano w zakresie potencjałów od -1150 mV do -850 mV względem elektrody chlorosrebrowej w odtlenionym elektrolicie podstawowym, zageszczając przy potencjale -1150 mV w czasie 30 s. Piki pochodzące od cynku obserwowano przy potencjale ok. -1100 mV. Po każdym dodatku próbki i wzorca rejestrowano 3 przebiegi krzywej woltamperometrycznej. Wzorec dodawano 3 krotnie. Analizę krzywych oraz interpretację wyników dokonywano przy użyciu programu EAGRAPH w wersji 6.0.

#### Wyniki badań

Anodowa woltamperometria stripingowa pozwala na precyzyjne (w stężeniach rzędu ppb) oznaczenie jonów cynku w materiale pochodzenia naturalnego oraz po jego wytrawianiu w roztworach soków trawiennych. Walidacja metody wskazuje na zadowalające parametry oznaczenia, nawet biorąc pod uwagę niskie odzyski spowodowane mineralizacją w piecu muflowym. W analizie jonów cynku wykorzystano metodę DP-ASV. W wyniku analiz stwierdzono, że zastosowanie wody mineralnej do sporządzenia ekstraktu z *B. monnieri* pozwala na najbardziej efektywne uzyskanie roztworu bogatego w jony cynku. Zawartości cynku oznaczone w materiale poddanym ekstrakcji do sztucznych soków trawiennych przedstawiono w Tabeli 1. Wyniki eksperymentu pozwoliły na stwierdzenie, że zastosowanie wody wysoko zmineralizowanej do ekstrakcji *B. monnieri* pozwala na uzyskanie najwyższego stężenia cynku w badanym materiale z podłoża MS, którego składniki rozpuszczono w wodzie mineralnej „Stefan” (ujęcie Szczawnica) oraz z podłoża MS z dodatkiem As (163,52 i 167,23 µg/mL). Najniższą zawartość stwierdzono natomiast w ekstraktach z kultur na

podłożu z dodatkiem seryny oraz z kapsułek (13,54 i 14,57 µg/mL).

Tabela 1. Ilości cynku oznaczone w biomasie z pedo-wych kultur *in vitro* *Bacopa monnieri*

Próbka	Zn [µg/mL]	SD
Materiał certyfikowany INCT-TL-1	25,18	1,29
Stefan woda mineralna (Szczawnica)	27,66×10 <sup>-3</sup>	0,01
<i>B. monnieri</i> woda Stefan	163,52	3,75
<i>B. monnieri</i> 0,1mg/L Zn	23,07	2,3
<i>B. monnieri</i> 1,0 mg/L seryna	13,54	3,14
<i>B. monnieri</i> 1,0 mg/L kwas antranilowy	22,28	5,44
<i>B. monnieri</i> 50 µg/L As	105,9	60,89
<i>B. monnieri</i> 400 µg/L As	167,23	9,26
<i>B. monnieri</i> 800 µg/L As	159,1	32,28
<i>B. monnieri</i> kapsułki	14,75	2,07

Wyniki dla trzech próbek powtórzonych trzykrotnie.

Oznaczone ilości cynku w sztucznych sokach trawiennych po cyklach uwalniania (30 minut dla soku żołądkowego i 90 minut dla soku jelitowego) przedstawiono w Tabeli 2.

Z wyjątkiem biomasy z podłoża MS w przypadku, którego zastosowano wodę mineralną „Stefan” we wszystkich próbkach większe ilości cynku zostały wyekstrahowane w soku żołądkowym. W biomasie *B. monnieri* z podłoża MS wzbogacanego Zn oznaczono najwyższą ilość Zn i wynosiła ona 6,88 µg/mL. Z kolei dla większości badanych próbek w soku jelitowym wartości mieściły się poniżej 1,36 µg/mL (Tabela 2). Czynnikiem ograniczającym uwalnianie cynku do soków trawiennych jest duża zawartość węglowodanów typowych dla roślin [19]. Na podstawie przeprowadzonych oznaczeń można stwierdzić, że zastosowanie podłoża MS wzbogacanego solami cynku, zwiększa akumulację tego pierwiastka w częściach rośliny, a tym samym więcej uwalnia się do soków trawiennych.

#### Resumo

*Bacopa monnieri* (Water hysop) estas hidrofito kreskanta en Azio kaj en sudaj regionoj de

Tabela 2. Ilość Zn w próbkach z kultur pędowych *Bacopa monnieri* po ekstrakcji do sztucznych soków trawienych

Próbka	Sok żołądkowy Zn [µg/mL]	SD	Sok jelitowy Zn [µg/mL]	SD
<i>B. monnieri</i> woda Stefan (Szcawnica)	0,14	0,07	0,24	0,18
<i>B. monnieri</i> 0,1 mg/L Zn	6,88	4,42	0,15	0,03
<i>B. monnieri</i> 1,0 mg/L seryna	0,20	0,06	0,12	0,04
<i>B. monnieri</i> 50 µg/L As	1,13	0,03	0,07	0,01
<i>B. monnieri</i> 400 µg/L As	0,30	0,12	0,06	0,07
<i>B. monnieri</i> 800 µg/L As	1,36	0,51	0,08	0,01
<i>B. monnieri</i> kapsułki	0,07	0,02	0,08	0,06

Wyniki dla trzech próbek powtórzonych trzykrotnie.

Usono. Tiu ĉi planto estas konata en Hindio kaj nomita kiel Brahmi kaj estis aplikata en la ajurveda medicino jam la pasintajn 5000 jarojn kiel trankviliganta, helpanta kuracadon de sendormemo kaj pliboniganta cerban cirkulado. Biologian efikon de tiu ĉi speco kaŭzas triterpenaj saponinoj – bakoizoj. La celo de tiu ĉi laboro estis ricevo de biomaso de *B. monnieri* laŭ *in vitro* sistemo kaj pritakso ĉu biomaso de *Bacopa monnieri* ricevita de *in vitro* kreskado sur la Murashiga-Skooga (MS) fluidaĵo kaj sur la sama fluidaĵo, sed kun aldonaĵo de organikaj kemioj kombinaĵoj kaj kun aldonaĵo de kemioj bioelementoj estos bona fonto de zinko por la homa organismo. En la eksperimento oni eluzis ankaŭ komercajn provaĵojn enhavantaj *B. monnieri*. Por determini la jonojn de zinko oni uzis la metodon DP-ASV. Rezulte oni konstatis, ke aplikado de alte mineralizita akvo por ricevi ekstraktojn de *B. monnieri* ebligas ricevi la plej altan koncentritecon de la jonoj de zinko en la ekzamenata materialo ricevita helpe de MS fluidaĵo, kies konsistaĵoj oni dilutis en la minerala akvo „Stefan” (kuracloko Szcawnica), kaj samtempe de MS fluidaĵo kun aldonaĵo de As (163,52 kaj 167,23 µg/mL). La plej malgrandan enhavon oni konstatis en ekstraktoj ricevita de biomaso kulturita sur la fluidaĵo kun aldonaĵo de serino en kulturaĵoj, simile en kapsuloj (13,54 kaj 14,57 µg/mL). En ekstraktoj je digestaj sukaj la plej altan kvanton de zinko oni determinis en biomaso ricevita uzante MS fluidaĵon kun aldonaĵo de kemioj kombinaĵoj de Zn en ekstrakto de la stomaka suko (6,88 µg/mL).

### Piŝmiennictwo

1. Kashmira, J.; Gohil, L.: Department of pharmacology, India, 2010, 1-6.

- Lojewski, M.; Muszyńska, B.; Sułkowska-Ziaja, K. Postępy Fitoterapii, 2014, 2, 84-89.
- Vangalapati, M.A.; Journal of Chemical Biological and Physical Science, 2011; 1:250-259.
- Russo, A.; Borrelli, F. Phytomed, 2005, 12, 305-317.
- Anonymous, I. The Ayurvedic Pharmacopoeia of India. 1999.
- Pati, I.D.P.; Bakliwar, S.L.; Rane, B.R.; Pawar, S.P. J Pharm Sci, 2012, 3194-3206.
- Singh, H.K.; Dhawan, B.N. J Ethnopharmacol, 1982, 5, 205.
- Chandrasekar, S.; Cell Molecul Neurobiological, 2012, 32:1099-1112.
- Shinomol, G.K.; Mythri, R.B.; Srinivas Bharath, M.M.; Muralidhara. Cell Mol Neurobiol, 2012, 32, 455-465.
- Mathew J. J BiomedSci, 2012; 19:1-13.
- Krishnakumar, A.; 2009; 16, 225-230.
- Kalyani, M.L.; J Nat Med., 2013, 67, 123-12.
- Muszyńska, B.; Lojewski, M.; Rojowski, J.; Opoka, W.; Sułkowska-Ziaja, K.; Psychiatria Polska, 2015, 49, 435-453.
- Lojewski, M.; Muszyńska, B.; Smalec, A.; Reczyński, W.; Sułkowska-Ziaja, K.; Opoka W.; Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174, 1535-4.
- Lojewski, M.; Pomierny, B.; Muszyńska, B.; Krzyżanowska, W.; Budziszewska, B.; Szewczyk, A.; Planta Medica., 2016, DOI: 10.1055/s-0035-1558166.
- Murashige, T.; Skoog, F.; Physiol Plant, 1962, 15, 473-497.
- Polish Pharmacopoeia, (9th ed). 2011, PTFarm, Warszawa.
- Neumann, M.; Goderska, K.; Grajek, K.; Grajek, W.; ZTNJ. 2006, 1, 30-45.
- Hunt JR. Am J Clin Nutr, 2003, 78, 633-639.