

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY**



Barbara Król-Kogus

**BADANIA SKŁADU CHEMICZNEGO I AKTYWNOŚCI
BIOLOGICZNEJ SUROWCA KRAJOWEGO
*FOENUGRAECI SEMEN***

ROZPRAWA DOKTORSKA

**PROMOTOR:
prof. dr hab. Mirosława Krauze - Baranowska, prof. nadzw.**

**KATEDRA I ZAKŁAD FARMAKOGNOZJI
Z OGRODEM ROŚLIN LECZNICZYCH**

Gdańsk, 2016

STRESZCZENIE

Kozieradka pospolita *Trigonella foenum-graecum* L. (*Fabaceae*) to jednoroczna roślina zielna, występująca na terenie Azji i basenu Morza Śródziemnego. Opisana w hinduskiej Ayurwedzie pod nazwą *methi*, *T. foenum-graecum* od wieków stosowana jest w tradycyjnej medycynie azjatyckiej. Nasienie kozieradki (*Foenugraeci Semen*) stanowi również popularny surowiec leczniczy w krajach europejskich. *Foenugraeci Semen* posiada monografię w Farmakopei Polskiej X oraz w Farmakopei Europejskiej i jest klasyfikowane jako surowiec śluzowy. Nasiona kozieradki stosowane są wewnętrznie jako środek odżywczy, wspomagający trawienie i leczniczy w schorzeniach przewodu pokarmowego, chorobie wrzodowej żołądka, stanach zapalnych oraz pomocniczo w terapii cukrzycy jako obniżające poziom cukru we krwi. Natomiast zewnętrznie surowiec stosowany jest w postaci kataplazmów na trudno gojące się rany oraz stany zapalne skóry i tkanki podskórnej. Obecnie nasienie kozieradki jest składnikiem coraz większej liczby suplementów diety dostępnych na krajowym rynku produktów roślinnych, stosowanych jako pomocnicze w terapii cukrzycy, trądziku oraz jako wzmacniające organizm.

Nasiona kozieradki zawierają szereg grup metabolitów wtórnych, wśród których, obok polisacharydów, dominującymi są C-glikozydy flawonowe oraz saponiny steroidowe, warunkujące wielokierunkową aktywność biologiczną surowca - m.in. przeciwzapalną, przeciwcukrzycową, przeciwdrobnoustrojową oraz przeciwnowotworową. Jakkolwiek, choć udowodniono zależność składu chemicznego od warunków wzrostu i uprawy kozieradki pospolitej, dotychczas badano wyłącznie skład chemiczny surowca pochodzenia azjatyckiego i afrykańskiego. W ciągu ostatnich 50-ciu lat ukazała się tylko jedna publikacja (1971) potwierdzająca obecność 4 C-glikozyloflawonów w surowcu pochodzenia krajowego. Biorąc pod uwagę wielokierunkową aktywność C-glikozydów flawonowych oraz saponin steroidowych (w tym niewyjaśniony w pełni wpływ na gospodarkę hormonalną człowieka w zakresie hormonów płciowych), rosnące zainteresowanie nasionami kozieradki (ponad 1000 publikacji w latach 2011-16) oraz ich wzrastającą popularność jako składnika suplementów diety, uznano za celowe badania nad związkami czynnymi surowca krajowego oraz jego aktywnością biologiczną.

W niniejszej rozprawie zaprezentowano wyniki analizy fitochemicznej *Foenugraeci Semen* pochodzenia krajowego oraz C-glikozydów flawonowych i saponin steroidowych jako składników surowca. Ponadto przedstawiono wyniki badań

aktywności przeciwnowotworowej i przeciwdrobnoustrojowej surowca oraz zawartych w nim związków czynnych.

Rozprawa doktorska składa się z trzech głównych części. Część pierwsza obejmuje aktualny stan wiedzy na temat składu chemicznego i aktywności biologicznej nasion kozieradki pospolitej oraz wykorzystania dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej w analizie związków flawonoidowych w matrycach roślinnych. W drugiej części rozprawy przedstawiono metodologię prowadzonych badań. Natomiast część trzecią dysertacji stanowi omówienie otrzymanych wyników analizy fitochemicznej oraz oceny aktywności biologicznej.

Cel pracy stanowiła jakościowa i ilościowa analiza nasienia kozieradki pochodzenia krajowego, w zakresie C-glikozydów flawonowych, izoflawonów oraz saponin steroidowych wraz z oceną aktywności biologicznej surowca oraz zawartych w nim związków czynnych.

Do badań przeznaczono nasiona kozieradki, otrzymane od trzech producentów - firmy zielarskie Lewandowski, Flos i Kawon. Dla celów analizy porównawczej wykorzystano nasiona kozieradki pochodzenia azjatyckiego i afrykańskiego.

W rezultacie przeprowadzonej analizy fitochemicznej opracowano i zoptymalizowano szereg metod chromatograficznych oraz procedur ekstrakcji badanych związków czynnych z surowca.

Oceniono wydajność wytrawiania C-glikozydów flawonowych z użyciem następujących technik ekstrakcyjnych: ekstrakcja w klasycznym aparacie Soxhleta, ekstrakcja w automatycznym aparacie Soxhleta, maceracja, ekstrakcja z użyciem mieszadła magnetycznego, sonikacja, ekstrakcja wspomagana mikrofalami, przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem. Stosowano zmienne parametry procesu (rodzaj rozpuszczalnika, czas, temperatura, moc, ilość cykli). Zawartość C-glikozyloflawonów w badanych ekstraktach oznaczono z użyciem opracowanej i zwalidowanej metody HPLC-DAD jako sumę, w przeliczeniu na apigeninę i luteolinę. Ujawniono różnice w profilach C-glikozydów flawonowych w otrzymanych ekstraktach, w zależności od użytego rozpuszczalnika. Spośród testowanych ekstrahentów najbardziej wydajnym był 70% metanol. Ponadto ujawniono różnice w zawartości badanych związków w zależności od stosowanej procedury wytrawiania. Wykazano, że wydajność ekstrakcji C-glikozydów flawonowych w automatycznym aparacie Soxhleta (25 cykli) jest zbliżona do wydajności ekstrakcji w klasycznym aparacie Soxhleta. Ponadto ujawniono, że w trakcie wytrawiania C-glikozyloflawonów 70% metanolem w procesie sonikacji, stężenie badanych związków w otrzymanym wyciągu wzrasta do 30. minuty, a następnie niezależnie od wydłużenia czasu trwania procesu, utrzymuje się na stałym poziomie i jest niższe niż w wyciągu otrzymanym w rezultacie trzykrotnej

sonikacji surowca z użyciem 70% metanolu. Udowodniono, że niezależnie od czasu trwania ekstrakcji wspomaganej mikrofalami (MAE), wydajność procesu jest zbliżona. Natomiast znaczące różnice w zawartości C-glikozyloflawonów obserwowano w wyciągach otrzymanych w wyniku przyspieszonej ekstrakcji rozpuszczalnikiem. Ponadto ujawniono i poddano dyskusji problemy analityczne związane z zastosowaniem tej techniki oraz 70% metanolu w odniesieniu do *Foenugraeci Semen*. Na podstawie wyników przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że najbardziej wydajnym było wytrawianie z użyciem mieszadła magnetycznego i 70% metanolu jako ekstrahentu (2 x 3 h, 2 x 100ml, temp. 60°C).

Analizę C-glikozydów flawonowych w wyciągach z nasienia kozieradki prowadzono z użyciem chromatografii cienkowarstwowej (TLC, 2D TLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (1D HPLC, 2D HPLC: LC-LC, LCxLC). Separację badanych związków metodą TLC prowadzono na płytkach HPTLC RP-18W F_{254S} z użyciem mieszaniny metanol:woda:kwas mrówkowy (40:60:6, v/v/v) jako fazy ruchomej. Ujawniono obecność 9 związków i potwierdzono występowanie w badanym surowcu witeksyny, izowiteksyny oraz izoorientyny. Natomiast na chromatogramie otrzymanym w rezultacie separacji 2D TLC z użyciem mieszaniny butanol:woda:kwas octowy (BAW) (3:1:1, v/v/v) (I kierunek) oraz 15% kwasu octowego (II kierunek) na płytkach pokrytych celulozą obserwowano 6 plam flawonów oraz 4 plamy innych związków, przypuszczalnie fenolokwasów.

Opracowano metodę 1D HPLC-DAD-ESI-MS rozdzielania składników zespołu C-glikozyloflawonów w wyciągu metanolowym z nasion kozieradki pospolitej, optymalizując fazę stacjonarną, fazę ruchomą oraz profil elucji gradientowej. Najlepsze rozdzielanie badanych związków, w formie 15 pików, otrzymano na kolumnie Kinetex C-18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 µm), w warunkach elucji gradientowej o profilu złożonym, obejmującym liniowy wzrost stężenia mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% wodnym TFA oraz elucję izokratyczną, w zakresie stężeń 16%-70% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% wodnym TFA (t_G 70 minut). Potwierdzono obecność: witeksyny, izowiteksyny, wiceniny-1, wiceniny-2, wiceniny-3, di-C-(6/8)-heksozylo-pentozydu, estrów p-kumarowych witeksyny/izowiteksyny i orientyny/izoorientyny oraz 5 nieznanymi związków, przypuszczalnie di-C-(6/8)-pentozydów apigeniny. Obecność wiceniny-3 w nasieniu kozieradki ujawniono po raz pierwszy. W opracowanych warunkach separacji 1D HPLC koelucji ulegały: orientyna i izoorientyna oraz szaftozyd i izoszaftozyd. Dodatkowo w widmach ESI-MS wzorcowych orientyny i izoorientyny obserwowano różnice w

intensywności sygnałów deprotonowanego jonu molekularnego przy m/z 447 $[M-H]^-$ (20% - orientyna, 100% - izoorientyna) oraz adduktu z TFA przy m/z 561 $[M-H+114]^-$ (100% - orientyna, 60% - izoorientyna). Ujawnione różnice mogą ułatwiać identyfikację orientyny i izoorientyny w matrycach roślinnych różnego pochodzenia.

Z uwagi na brak separacji w warunkach 1D HPLC wzorcowych mono-C-glukozydów luteoliny (orientyna i izoorientyna) oraz di-C-(6/8)-glukozylo-arabinozydów apigeniny (szaftozyd i izoszaftozyd), kolejny etap pracy stanowiło opracowanie warunków rozdzielania C-glikozyloflawonów w wyciągu metanolowym z nasienia kozieradki z użyciem dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (2D LC) oraz technik: *heart-cutting* (LC-LC) i *comprehensive* (LCxLC), w trybach *off-line* i *on-line*.

Początkowo opracowano warunki rozdzielania badanych związków metodą LC-LC *off-line*, stosując w pierwszym wymiarze kolumnę Sphinx C-18-Phenyl oraz elucję gradientową o profilu gradientu złożonym, obejmującym liniowy wzrost stężenia mieszaniny metanol:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) od 40% do 60% w 0,1% wodnym TFA w ciągu pierwszych 5 minut, a następnie elucję izokratyczną przy stężeniu 60% mieszaniny metanol:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% wodnym TFA przez kolejne 10 minut (t_G 15 minut) przy prędkości przepływu 0,05 ml/min. W rezultacie z kolumny 1D zebrano 9 frakcji (I-IX), których składniki następnie rozdzielono w 2D na kolumnie Kinetex C-18 w warunkach elucji izokratycznej z użyciem faz ruchomych, eksperymentalnie dobranych dla każdej frakcji 1D , o różnym stężeniu mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% wodnym TFA: frakcje I i II - 32%, frakcja III - 20%, 23%, 32%, frakcja IV - 30%, frakcje V-VII - 35%, frakcja VIII - 45%, frakcja IX - 50%. W opracowanych warunkach otrzymano rozdzielanie wszystkich C-glikozydów flawonowych wyciągu metanolowego z nasion kozieradki pochodzenia krajowego, w tym izomerów: orientyny - izoorientyny oraz szaftozydu - izoszaftozydu. Obecność izoszaftozydu w surowcu ujawniono po raz pierwszy.

Kolejny etap prac stanowiło opracowanie warunków separacji badanych związków metodą *comprehensive off-line*. W 1D użyto kolumnę Sphinx C-18-Phenyl. W rezultacie optymalizacji kompozycji fazy ruchomej oraz profilu gradientu, najlepsze rozdzielanie uzyskano w warunkach elucji gradientowej, obejmującej elucję izokratyczną przy stężeniu 43% (t_G 0-1,2 min) mieszaniny metanol:ACN:woda:TFA (330:40:80:0,45 v/v/v/v) w 0,1% TFA, a następnie liniowy wzrost jej stężenia od 43% do 90% w czasie t_G 1,2-47 minut (t_G 47 min) przy prędkości przepływu 0,017 ml/min. Otrzymany profil 1D LCxLC *off-line* był zbliżony do profilu 1D LC-LC. Badany wyciąg podzielono na 12 frakcji (I'-XII'), spośród których 9 odpowiadało frakcjom uzyskanym w systemie LC-LC, natomiast 3 pozostałe frakcje dodano aby spełnić podstawowe

założenie techniki *comprehensive* o rozdzielaniu w ²D całego eluatu z ¹D. W ²D wykorzystano kolumnę Discovery HS C-18 zamiast stosowanej w systemie LC-LC kolumny Kinetex, uwzględniając jej mniejszą długość przy zbliżonej średnicy, umożliwiającą utrzymanie profilu rozdzielania składników każdej frakcji ¹D w ²D. Składniki frakcji I'-XII' rozdzielano w ²D w warunkach elucji izokratycznej, eksperymentalnie dobranych dla każdej frakcji ¹D o nieznacznie zmodyfikowanych w odniesieniu do ²D systemu LC-LC stężeniach mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% wodnym TFA: frakcja I' - 26%, frakcja II' - 30%, frakcja III' - 32%, frakcje IV', V', VII' - 35%, frakcja VI' - 36%, frakcje VIII' i IX' - 38%, frakcje X' i XI' - 50%, frakcja XII' - 55%.

Opracowano w pełni automatyczną metodę *comprehensive on-line* (LCxLC) separacji C-glikozydów flawonowych nasienia kozieradki. Użyto tych samych kolumn, które stosowano w systemie LCxLC *off-line* oraz tego samego programu elucji gradientowej w ¹D. Natomiast w ²D opracowane warunki separacji C-glikozyloflawonów połączono w gradient o profilu skokowym, w którym pojedynczy skok obejmował separację związków poszczególnych frakcji w warunkach elucji izokratycznej. Dobry eksperymentalnie czas modulacji był zmienny i wynosił: frakcja I' – 2,7 min, frakcja II' – 2,1 min, frakcja III' – 2,5 min, frakcja IV' – 3,0 min, frakcja V' – 1,5 min, frakcja VI' – 2,6 min, frakcja VII' – 2,3 min, frakcja VIII' – 3,1 min, frakcja IX' – 2,9 min, frakcja X' – 2,1 min, frakcja XI' – 2,5 min, frakcja XII' – 4,0 min. Separację HPLC w ¹D prowadzono w sprzężeniu z detektorem DAD, natomiast w ²D w sprzężeniu z detektorami DAD i MS. W rezultacie w opracowanych warunkach metody LCxLC *on-line*, otrzymano rozdzielanie wszystkich C-glikozyloflawonów, z wyjątkiem szaftozydu i izoszaftozydu, które ulegały koelucji. Udowodniono, że czas konieczny dla otrzymania ich separacji wynosi minimum 25 min, dlatego rozdzielanie szaftozydu i izoszaftozydu jest możliwe jedynie w warunkach opracowanej metody LC-LC *off-line*.

Kolejny etap prac stanowiło opracowanie zwalidowanej metody LC-LC-DAD *on-line* analizy ilościowej C-glikozydów flawonowych nasienia kozieradki. W zoptymalizowanych warunkach rozdzielania 1D HPLC oznaczono zawartość 11 związków, z wyjątkiem orientyny, izorientyny, szaftozydu i izoszaftozydu, które zebrano w formie pojedynczej frakcji, a następnie rozdzielono w ²D na kolumnie Kinetex C-18 przy stężeniu 23% mieszaniny ACN:woda:TFA (50:50:0,1, v/v/v) w 0,1% TFA. Opracowaną metodę LC-LC-DAD *on-line* wykorzystano do oznaczenia zawartości C-glikozydów flawonowych w różnych wyciągach z nasienia kozieradki pochodzenia polskiego: 70% metanolu, wodnym oraz frakcji wyciągu metanolowego.

Z użyciem opracowanych metod HPLC-DAD-ESI-MS and LC-LC-DAD-ESI-MS ujawniono różnice w profilach HPLC C-glikozyloflawonów w nasionach kozieradki

pochodzenia tureckiego i afrykańskiego, w porównaniu do surowca pochodzenia krajowego. W *Foenugraeci Semen* pochodzenia tureckiego i afrykańskiego ujawniono występowanie 4 dodatkowych C-glikozyloflawonów, przypuszczalnie dwóch di-C-(6/8)-heksozylo-pentozydów apigeniny oraz dwóch di-C-(6/8)-heksozydów apigeniny. Ponadto w rezultacie rozdzielania badanych związków w wyciągach metanолоwych z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego oraz afrykańskiego z użyciem opracowanej metody LC-LC-DAD-ESI-MS ujawniono, że profile orientyny, izoorientyny, szaftozydu i izoszaftozydu są zbliżone, a dominującym związkiem jest izoszaftozyd, obok szaftozydu i orientyny, występujących w mniejszych ilościach, podczas gdy stężenie izoorientyny jest znacząco niższe. Natomiast w nasionach kozieradki pochodzenia tureckiego, mono-C-glukozydy luteoliny (orientyna i izoorientyna) stanowiły związki dominujące, podczas gdy szaftozyd i izoszaftozyd występowały w niskich stężeniach.

Ponieważ według danych literaturowych, nasiona kozieradki zawierają naturalne fitoestrogeny - izoflawony, przeprowadzono analizę tych związków w warunkach opracowanej metody 1D HPLC-DAD-ESI-MS, wobec 5 związków wzorcowych. Nie wykazano obecności izoflawonów w wyciągu metanолоwym z *Foenugraeci Semen* pochodzenia krajowego, co istotnie różni badany materiał roślinny od niektórych nasion kozieradki pochodzenia azjatyckiego.

W analizie zespołu saponin steroidowych wykorzystano chromatografię cienkowarstwową (TLC, 2D TLC) oraz wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) w sprzężeniu z laserowym detektorem światła rozproszonego (ELSD) oraz spektrometrem mas (MS).

Z użyciem TLC, 2D TLC oraz TLC z gradientem fazy stacjonarnej, ujawniono obecność zespołu saponin furostanowych w surowcu pochodzenia krajowego (derywatyżacja odczynnikami Ehrlicha). Najlepsze rozdzielanie badanych związków otrzymano na płytkach chromatograficznych HPTLC Si60 F₂₅₄ z użyciem mieszaniny chloroform:metanol:kwasa mrówkowego (30:20:2, v/v/v) jako fazy ruchomej. Na otrzymanym chromatogramie TLC obserwowano 9 pasm saponin furostanowych.

Zoptymalizowano warunki oznaczenia ilościowego diosgeniny po hydrolizie kwasowej w nasieniu kozieradki, w zakresie warunków ekstrakcji, hydrolizy kwasowej, separacji TLC (faza stacjonarna, faza ruchoma, odczynnik wywołujący) oraz analizy densytometrycznej. Udowodniono, że najbardziej wydajną metodą wytrawiania jest

trójstopniowa, wyczerpująca ekstrakcja w aparacie Soxhleta z użyciem kolejno eteru naftowego, chloroformu oraz metanolu, a następnie hydroliza kwasowa wyciągu metanolowego z użyciem 2M wodnego roztworu kwasu siarkowego (VI) (temp. 80°C, 2 h). Najlepsze rozdzielanie TLC otrzymano na płytkach chromatograficznych HPTLC Si60 F₂₅₄ z użyciem mieszaniny heptan:octan etylu (7:3, v/v) jako fazy ruchomej, w automatycznej komorze chromatograficznej ADC2, w temperaturze 22±2°C oraz stałej wilgotności 47% (nasycony roztwór tiocyjanianu potasu). Otrzymane chromatogramy TLC poddano wizualizacji z użyciem zmodyfikowanego roztworu aldehydu anyżowego. Opracowaną metodę zwalidowano i wykorzystano do oznaczenia zawartości diosgeniny po hydrolizie kwasowej w nasionach kozieradki pochodzenia krajowego, otrzymanych od trzech producentów: Lewandowski (0,12%), Kawon (0,12%) i Flos (0,13%).

Opracowano metodę HPLC-ELSD-ESI-MS analizy jakościowej i ilościowej saponin steroidowych w wyciągu metanolowym z nasion kozieradki pospolitej. Rozdzielenia prowadzono na dwóch połączonych szeregowo kolumnach Discovery C-18 (150 mm x 2,1 mm x 3 µm) w warunkach elucji gradientowej, obejmującej liniowy wzrost stężenia ACN od 20% do 100% w 0,1% kwasie mrówkowym (t_c 90 minut, profil gradientu liniowo-skokowy). Otrzymano separację składników zespołu saponin steroidowych w formie 13 pików.

Nie wykazano różnic w profilu HPLC-ELSD-ESI-MS saponin steroidowych wyciągu metanolowego z surowca w porównaniu do wyciągu etanolowego. Dlatego wykluczono obecność artefaktów - 22-metoksy pochodnych saponin.

Z użyciem detektora masowego ujawniono obecność 26 saponin steroidowych w badanym surowcu, spośród których 24 wstępnie zidentyfikowano w oparciu o otrzymane dane spektralne i chromatograficzne (wartości t_R , m/z), przypisując im struktury związków, rozpoznanych wcześniej w nasieniu kozieradki pospolitej. Ponadto nie wykazano istotnych różnic w profilach badanych związków w surowcach pochodzenia tureckiego i afrykańskiego w porównaniu do nasion kozieradki pochodzenia krajowego. Dominującymi związkami były protodioscyna oraz trigoneozyd Vb. Trigoneozyd IVa i jego 25-epimer - glikozyd F, trigoneozyd Va oraz trigonellozyd C (protoneodioscyna) były obecne w niższych stężeniach. Wymienione związki są pochodnymi diosgeniny (protodioscyna, trigoneozyd Vb, glikozyd F) i jamogeniny (trigonellozyd C, trigoneozyd IVa, trigoneozyd Va) i stanowią źródło diosgeniny, uwalnianej w wyniku hydrolizy kwasowej, ponieważ izomery 25S i 25R ulegają epimeryzacji. Jamogenina w środowisku kwaśnym może ulegać przekształceniu do

diosgeniny. Otrzymane profile HPLC saponin steroidowych w *Foenugraeci Semen* różnią się od profili HPLC i UPLC opisanych w literaturze.

Kolejny krok stanowiło opracowanie zwalidowanej metody HPLC-ELSD oznaczenia ilościowego saponin steroidowych w badanym materiale roślinnym. Zawartość saponin, w przeliczeniu na protodioscynę, oznaczono w wyciągach: 70% metanolu ($163,182 \pm 11,03 \mu\text{g}$), wodnym ($63,134 \pm 8,14 \mu\text{g}$) oraz frakcji wyciągu metanolowego ($163,182 \pm 11,3 \mu\text{g}$) z nasion kozieradki pospolitej pochodzenia krajowego. Ponadto, oznaczono zawartość saponin steroidowych w surowcach pochodzenia tureckiego i afrykańskiego (0,20 %).

Ocenę aktywności biologicznej nasion kozieradki pochodzenia krajowego przeprowadzono w zakresie aktywności cytotoksycznej oraz przeciwdrobnoustrojowej. Do badań przeznaczono różne wyciągi z surowca - wodno-alkoholowy, wodny i frakcję wyciągu metanolowego oraz wybrane związki czynne z grupy C-glikozydów flawonowych, sapogenin steroidowych oraz alkaloidów.

Aktywność cytotoksyczną ekstraktów z *Foenugraeci Semen* oraz pojedynczych związków czynnych oceniano wobec linii komórkowych: ludzkiego raka szyjki macicy HeLa, ludzkiego gruczolakoraka jajnika SKOV-3 oraz ludzkiej białaczki limfoblastycznej MOLT-4. Jak kontrolę wykorzystano linię komórkową ludzkich keratynocytów HaCaT. Badania prowadzono w użyciu testu MTT oraz systemu RealTimeXCELLigence (RTCA). System RTCA zastosowano w ocenie aktywności cytotoksycznej *Foenugraeci Semen* po raz pierwszy.

Najsilniejszą aktywność cytotoksyczną ujawniła frakcja wyciągu metanolowego (D), dla której oznaczone wartości IC_{50} wyniosły odpowiednio: wobec HeLa $3,91 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $3,99 \pm 0,26 \mu\text{g/ml}$ (RTCA), wobec linii SKOV-3 $3,97 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $2,26 \pm 0,78 \mu\text{g/ml}$ (RTCA) oraz wobec linii MOLT-4 $7,75 \pm 0,37 \mu\text{g/ml}$ (MTT). Wyciąg wodno-alkoholowy wykazywał słabszą aktywność wobec badanych linii komórkowych, z oznaczonymi wartościami IC_{50} : wobec HeLa $13,47 \pm 0,62 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $9,65 \pm 0,78 \mu\text{g/ml}$ (RTCA), wobec SKOV-3 $10,34 \pm 0,16 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $7,73 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ (RTCA) oraz wobec MOLT-4 $16,18 \pm 1,14 \mu\text{g/ml}$ (MTT), odpowiednio. Najśłabszą aktywność ujawnił wyciąg wodny, a oznaczone wartości IC_{50} wyniosły: wobec HeLa $17,43 \pm 0,3$ (MTT) i $31,45 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$ (RTCA), wobec SKOV-3 $16,68 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $26,4 \pm 0,71 \mu\text{g/ml}$ (RTCA) oraz wobec MOLT-4 $26,55 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$ (MTT), odpowiednio. Natomiast wyciąg metanolowy był nieaktywny.

Spośród badanych związków czynnych, znaczącą aktywność cytotoksyczną wobec badanych linii komórkowych ujawniły sapogeniny steroidowe, podczas gdy C-

glikozydy flawonowe oraz trygonelina były nieaktywne. Otrzymane wyniki stanowią pierwsze doniesienia dotyczące aktywności proapoptotycznej jamogeniny, tigogeniny wobec wszystkich badanych linii komórkowych oraz pierwsze doniesienie o aktywności proapoptotycznej diosgeniny wobec linii gruczolakoraka jajnika SKOV-3. Oznaczone wartości IC_{50} badanych sapogenin wobec linii raka szyjki macicy HeLa wyniosły odpowiednio: jamogenina - $16,5 \pm 0,59 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $19,6 \pm 1,41 \mu\text{g/ml}$ (RTCA), diosgenina - $16,3 \pm 0,26 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $28,0 \pm 2,40 \mu\text{g/ml}$ (RTCA), tigogenina $35,6 \pm 3,69 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $25,1 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$ (RTCA). Wobec linii komórek gruczolakoraka jajnika SKOV-3 badane sapogeniny ujawniły zbliżoną aktywność z wyznaczonymi wartościami IC_{50} odpowiednio: jamogenina - $16,7 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $23,9 \pm 1,48 \mu\text{g/ml}$ (RTCA), diosgenina - $19,3 \pm 0,97 \mu\text{g/ml}$ (MTT) i $16,9 \pm 2,89 \mu\text{g/ml}$ (RTCA), esmilagenina - $17,96 \pm 1,29 \mu\text{g/ml}$ (MTT), tigogenina - $28,3 \pm 3,46 \mu\text{g/ml}$ (RTCA) oraz $> 50 \mu\text{g/ml}$ (MTT).

Ponieważ najsilniejszą aktywnością cytotoksyczną charakteryzowała się frakcja wyciągu metanolowego (D), kolejny etap prac stanowiły badania mechanizmów aktywności proapoptotycznej frakcji D wobec linii komórek HeLa i SKOV-3. Oznaczono procent komórek apoptotycznych, który w komórkach SKOV-3 wynosił 50% przy stężeniu badanej frakcji D $10 \mu\text{g}$, natomiast w komórkach HeLa - 50% przy stężeniu $100 \mu\text{g}$ badanej frakcji D. Linia komórkowa SKOV-3 charakteryzowała się większą wrażliwością na składniki frakcji D.

Analiza aktywności kaspaz 3 i 7 ujawniła ich zaangażowanie w proces śmierci komórek nowotworowych pod wpływem składników frakcji D, co potwierdza indukcję apoptozy w komórkach linii HeLa i SKOV-3.

W rezultacie badań zmian błonowego potencjału mitochondrialnego w komórkach linii HeLa i SKOV-3 po 12 godzinach inkubacji z różnymi stężeniami badanej frakcji D obserwowano zależne od dawki zmiany potencjału błony mitochondrialnej w hodowli komórek SKOV-3, co potwierdza zaangażowanie wewnętrznego szlaku indukcji apoptozy w śmierć komórek gruczolakoraka jajnika SKOV-3 pod wpływem frakcji D. Natomiast w hodowli komórek HeLa nie obserwowano zmian błonowego potencjału mitochondrialnego.

Otrzymane wyniki pomiaru zmian poziomu wolnych rodników (ROS) ujawniły, że w rezultacie inkubacji z frakcją D poziom ROS wzrasta, co jest związane z występowaniem stresu oksydacyjnego, który może prowadzić do indukcji kaspazy-12 i wewnętrznego szlaku apoptozy.

Ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągów z nasiona kozieradki pospolitej oraz wybranych związków czynnych prowadzono wobec szeregu szczepów

bakteryjnych. Udowodniono, że szczepem o największej wrażliwości na przetwory z *Foenugraeci Semen* oraz pojedyncze metabolity wtórne – składniki chemiczne surowca był *Helicobacter pylori*, z najniższą wartością MBC 0,27 mg/ml dla wyciągu wodno-alkoholowego. Wyciąg wodny był nieaktywny. Otrzymane wyniki wskazują, że w celu efektywnego wspierania terapii choroby wrzodowej, przebiegającej z zakażeniem *H. pylori*, wskazane jest stosowanie wyciągów wodno-alkoholowych lub alkoholowych, posiadających aktywność przeciwbakteryjną wobec patogenu. Natomiast wyciągi wodne mogą pełnić rolę pomocniczą jako przeciwzapalne i ułatwiające gojenie niszy wrzodowej. Spośród badanych związków czynnych, witeksyna ujawniła najsilniejszą aktywność bakteriobójczą wobec *H. pylori*, z wartością MBC 0,03 mg/ml, obok saponin steroidowych, dla których wartości MBC wyniosły odpowiednio: 0,0625 mg/ml (tigogenina i sarsasapogenina) oraz 0,125 mg/ml (diosgenina). Natomiast orientyna ujawniła jedynie efekt bakteriostatyczny, a oznaczona wartość MIC wyniosła 0,125 mg/ml.

W rezultacie przeprowadzonych badań rozpoznano skład chemiczny surowca krajowego w zakresie C-glikozydów flawonowych i saponin steroidowych.

Opracowane metody 2D LC mogą być przydatne w analizie składu chemicznego nasion kozieradki różnego pochodzenia oraz w identyfikacji C-glikozyloflawonów w innych matrycach roślinnych.

Uwzględniając wykazany w surowcu krajowym brak izoflawonów oraz oznaczoną niską zawartość diosgeniny, wydaje się, że *Foenugraeci Semen* pochodzenia krajowego może stanowić bardziej bezpieczny surowiec w porównaniu do nasion kozieradki pochodzenia azjatyckiego, w zakresie potencjalnego wpływu na gospodarkę hormonalną i poziomy hormonów płciowych.

SUMMARY

Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L., *Fabaceae*) is annual herbaceous plant, widespread in Asia and Mediterranean region. Described in ancient Ayurveda as *methi*, fenugreek (especially its seeds) was used for centuries in traditional Asian medicine. Nowadays, the seed of fenugreek (*Foenugraeci Semen*) is also a popular healing agent in European phytotherapy, applied internally and externally. *Foenugraeci Semen* has a monographs as a mucilaginous plant material in both Polish Pharmacopoeia X and European Pharmacopoeia. The chemical composition of *Foenugraeci Semen* consists of several groups of plant secondary metabolites of which, besides polysaccharides, flavone C-glycosides and steroidal saponins are the most abundant and responsible for multidirectional biological activity of fenugreek seeds, including antidiabetic, hypolipidemic and anti-inflammatory. However, in the field of principal compounds, only the chemical composition of Asian and African plant material was recognized so far, though it is known as depending on the growth or cultivation conditions. For the last five decades, only one paper (1971) concerns the presence of 4 C-glycosylflavones in Polish *Foenugraeci Semen*. Taking into account the biological activity of flavone C-glycosides and steroidal saponins (including their unclear influence on human sex hormones), growing interest in fenugreek seeds (over 1000 of publications in the past five years) and fact that they are getting more popular as the ingredients of increasing number of dietary supplements, the need of phytochemical characteristic of secondary metabolites in Polish fenugreek seeds arises.

This thesis presents phytochemical and biological investigation of flavone-C-glycosides and steroidal saponins in *Foenugraeci Semen* of Polish origin and evaluation of its anticancer and antibacterial activity, not described previously in the literature or for which the insufficient data exist.

Presented dissertation consists of three main parts. The first part contains the general botanical, phytochemical and pharmacological characteristic of an investigated *Foenugraeci Semen*. Moreover, it discusses the current state of knowledge about the application of two-dimensional high-performance liquid chromatography in the analysis of flavonoids. The second part explains research methodology. In the third part the results of phytochemical studies are presented together with the study on biological activity.

The main objective was the qualitative and quantitative analysis of Polish fenugreek seeds in terms of three main groups of chemical compounds: flavone-C-glycosides, isoflavones and steroidal saponins together with the evaluation of biological activity of this plant material and its selected secondary metabolites.

For the experiments fenugreek seeds of unknown chemical composition, obtained from three Polish herbal companies were used, namely: Lewandowski, Flos, Kawon. Additionally for comparative analysis also the plant material of Turkish and African origin was used.

As a result of phytochemical studies, several chromatographic methods were developed and optimized together with optimized extraction procedures for the analysis of flavone-C-glycosides and steroidal saponins.

The influence of extraction mode on the yield of C-glycosylflavones from fenugreek seeds was examined. Several techniques were tested: extraction in classic and automatic Soxhlet apparatus, maceration, extraction with the use of magnetic stirrer, sonication, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction. Additionally, different parameters of process were examined (time, solvent, temperature, power, number of cycles) depending on the technique used. The amount of flavone-C-glycosides in obtained extracts, calculated on apigenin or luteolin, was quantified with the use of established HPLC-DAD method.

The differences in the obtained chromatographic profiles of C-glycosylflavones depending on the extraction solvent used, were revealed. The most effective extracting solvent was 70% methanol. Moreover, also the differences in the amount of analyzed compounds in extracts, obtained through various extraction techniques were revealed. The efficiency of flavone-C-glycosides extraction by the use of automatic Soxhlet apparatus (25 cycles) was similar to the exhaustive extraction in classic Soxhlet apparatus. It was proved, that during the sonication with 70% methanol, the concentration of C-glycosylflavones depends on temperature, but increases only till the 30. min, remaining stable even if process is prolonged. However, it was still lower than in the extract obtained by triple sonication with 70% methanol. The result of microwave extraction with 70% methanol showed that independently on the time and power of this process, the effectiveness of extraction remains similar. The significant differences in the amount of analyzed compounds were observed as a result of accelerated solvent extraction. Some analytical difficulties in the application of this method for the extraction of *Foenugraeci Semen* with 70% methanol were revealed and discussed. On the basis of performed experiments, the most effective method for the flavone-C-

glycosides from fenugreek seeds was: the extraction on magnetic stirrer with 70% methanol (2 x 3 h, 2 x 100 ml, temp. 60°C).

Analysis of C-glycosylflavones was performed with the use of thin layer chromatography (TLC, 2D TLC) and high-performance liquid chromatography (1D HPLC, 2D HPLC: LC-LC, LCxLC). The TLC analyses on HPTLC RP-18W F_{254S} plates with the mobile phase methanol:water:formic acid (40:60:6, v/v/v) revealed the presence of 9 compounds and confirmed the presence of vitexin, isovitexin and isoorientin. The 2D TLC analyses were performed on cellulose plates with the use of the mixtures butanol:water:acetic acid (BAW) (3:1:1, v/v/v) (1st direction) and 15% acetic acid (2nd direction). On the obtained chromatograms 6 spots of flavones and 4 spots tentatively identified as phenolic acids were observed.

The HPLC-DAD-ESI-MS method for the qualitative analysis of flavone-C-glycosides in the methanol extract from fenugreek seeds was established. In the optimization process different columns, mobile phases and gradient programs were tested. The best separation was achieved on Kinetex C-18 column (100 mm x 2,1 mm x 2,6 µm) under the gradient elution according to program I, comprising the linear increase of concentration of the mixture ACN:water:TFA (50:50:0,1, v/v/v) from 16% to 70% in 0,1% TFA and the isocratic elution (t_G 70 minutes). The separation of analyzed compounds was obtained in the form of 15 peaks. The presence of: vitexin, isovitexin, vicenin-1, vicenin-2, vicenin-3, apigenin di-C-(6/8)-hexosyl-pentoside, p-coumaric esters of vitexin/isovitexin and orientin/isoorientin together with 5 unknown compounds, tentatively identified as apigenin di-C-(6/8)-pentosides was revealed. The presence of vicenin-3 was revealed in fenugreek seeds for the first time. In the established chromatographic conditions (1D HPLC) orientin and isoorientin as well as schaftoside and isoschaftoside were coeluting. Additionally HPLC-DAD-ESI-MS analyses of reference substances - orientin and isoorientin revealed differences in the intensity of deprotonated molecular ions signals at m/z 447 [M-H]⁻ (20% - orientin, 100% - isoorientin) and adducts with TFA at m/z 561 [M-H+114]⁻ (100% - orientin, 60% - isoorientin). Observed differences in the ESI-MS spectra of orientin and isoorientin may be helpful in the HPLC-DAD-ESI-MS identification of these compounds in plant matrices of different origin.

Due to not achieving the separation of reference isomeric luteolin mono-C-glucosides (orientin and isoorientin) and isomeric apigenin di-C-(6/8)-glucosyl-arabinosides (schaftoside and isoschaftoside) in 1D HPLC, next step was

establishment the conditions for two-dimensional HPLC separations of C-glycosylflavones from fenugreek seeds with the use of *heart-cutting* (LC-LC) and *comprehensive* (LCxLC) techniques in both *off-line* and *on-line* modes.

Firstly, C-glycosylflavones in the methanol extract of fenugreek seeds were separated in the optimized *heart-cutting* (LC-LC) *off-line* method, which was the introduction to the establishment of the *comprehensive off-line* and *on-line* system. In the first dimension the LC-LC method, the Sphinx C-18-Phenyl column and gradient elution were used. The gradient program was characterized by the increasing concentration of the mixture methanol:water:TFA (50:50:0.1, v/v/v) from 40% to 60% in the 0.1% aqueous TFA in the first 5 minutes, followed by the isocratic elution at 60% of the mixture methanol:water:TFA (50:50:0.1, v/v/v) in the 0.1% aqueous TFA for next 10 minutes (t_G 15 minutes) at flow rate 0.05 ml/min. As a result of first-dimensional separation the extract was divided into nine fractions (I-IX), which ingredients were further successively separated in the second dimension on Kinetex C-18 column with the use of isocratic elution at experimentally assorted concentration of the mixture ACN:water:TFA (50:50:0.1, v/v/v) in 0.1% aqueous TFA: fractions I and II - 32%, fraction III - 20%, 23%, 32%, fraction IV - 30%, fraction V-VII - 35%, fraction VIII - 45%, fraction IX - 50%. In the established conditions all C-glycosylflavones in the analyzed extract were separated, including isomers: orientin - isorientin and schaftoside - isoschaftoside. The presence of isochsachtoside in fenugreek seeds was revealed for the first time.

Next, the comprehensive *off-line* method was established. In the first dimension separation was performed on Sphinx C-18-Phenyl column. As a result of mobile phase composition optimization, comprising mixtures of different organic solvents and different gradient programs, the best separation was obtained with the use of the mixture methanol:ACN:water:TFA (330:40:80:0.45 v/v/v/v) in 0.1% aqueous TFA under gradient elution. The gradient program comprised initially isocratic elution at 43% (0-1.2 min) and next the linear increase mixture of methanol:ACN:water:TFA (330:40:80:0.45 v/v/v/v) in 0.1% aqueous TFA from 43% to 90% in t_G 1.2-47 minutes (t_G 47 min) at flow rate 0.017 ml/min. The obtained ¹D LCxLC *off-line* profile was similar to the in ¹D profile obtained in LC-LC method. Analyzed extract was divided into 12 fractions (I'-XII'), 9 of which corresponded to the fractions obtained in LC-LC method and 3 fractions were added to maintain comprehensive technique assumption of transferring the whole eluate from the first dimension to the second one. In the ²D the Discovery HS C-18 column was used instead of Kinetex column, due to its smaller length, while maintaining the separation profile of each fraction components in ²D. Ingredients of fractions I'-XII' were separated under experimentally assorted isocratic elution

conditions and some additional modifications in the concentration of ²D mobile phase (mixture ACN:water:TFA 50:50:0.1, v/v/v in 0.1% aqueous TFA) were made: fraction I' - 26%, fraction II' - 30%, fraction III' - 32%, fractions IV', V', VII' - 35%, fraction VI' - 36%, fractions VIII' and IX' - 38%, fractions X' and XI' - 50%, fraction XII' - 55%.

Finally, the fully automatic comprehensive (LCxLC) *on-line* method for the separation of C-glycosylflavones in the methanol extract from fenugreek seeds was established. The same columns were used as in the *off-line* LCxLC. In the first dimension also the same gradient elution was applied, while in the second dimension the established isocratic conditions for the separation of analyzed compounds were connected into the stepwise gradient, of which each step comprised single fraction separation at isocratic conditions. The modulation time was changeable and experimentally assorted: fraction I' – 2.7 min, fraction II' – 2.1 min, fraction III' – 2.5 min, fraction IV' – 3.0 min, fraction V' – 1.5 min, fraction VI' – 2.6 min, fraction VII' – 2.3 min, fraction VIII' – 3.1 min, fraction IX' – 2.9 min, fraction X' – 2.1 min, fraction XI' – 2.5 min, fraction XII' – 4.0 min. In the ¹D the DAD detector was used, while in the ²D both DAD and MS detectors were applied. As the result in the established *on-line* LCxLC method, all C-glycosylflavones were separated, except for schaftoside and isoschaftoside which were coeluting. It was demonstrated that their separation is possible only in the established *off-line* LC-LC-DAD-ESI-MS method, as the time needed for it is at least 25 minutes.

Next, the quantitative LC-LC-DAD *on-line* method for the estimation of C-glycosylflavones in fenugreek seeds was established. In the conditions optimized for one-dimensional HPLC separation and 11 compounds were quantified, apart from orientin, isoorientin, schaftoside and isoschaftoside, which were collected in a form of fraction, subsequently separated on Kinetex C-18 column at 23% concentration of the mixture ACN:water:TFA (50:50:0.1, v/v/v) in 0.1% aqueous TFA. The established method was applied to the quantitative analysis of C-glycosylflavones in obtained different extracts from plant material of Polish origin: alcohol-aqueous, aqueous and the fraction of methanol extract.

Comparative analysis of the C-glycosylflavones in Turkish and African fenugreek seeds was performed with the use of established HPLC-DAD-ESIMS and LC-LC-DAD-ESIMS methods. The qualitative differences were revealed. In comparison with Polish plant material, both Turkish and African contained 4 additional flavone C-glycosides: two apigenin di-C-(6/8)-hexosyl-pentosides and 2 apigenin di-C-(6/8)-hexosides. Additionally, the separation of methanol extracts with the use of LC-LC-DAD-ESI-MS method demonstrated that the profile of orientin, isoorientin, schaftoside

and isoschaftoside are similar in Polish and African plant material with the isoschaftoside being the most abundant, next to schaftoside and orientin, present in lower concentration, while the concentration of isoorientin is significantly lower. On the other hand, in fenugreek seeds of Turkish origin, luteolin mono-C-glucosides (orientin and isoorientin) are the most abundant, while schaftoside and isoschaftoside are minor components.

As fenugreek seeds are known to contain natural phytoestrogens - isoflavones, the analysis of these compounds was performed in the established 1D HPLC-DAD-ESI-MS conditions in the comparison with 5 standards. However, none isoflavones were detected in the methanol extract from *Foenugraeci Semen* of Polish origin, which significantly differs this plant material from fenugreek seeds originated from the other parts of the world.

In the analysis of steroidal saponins different chromatographic techniques were used, namely: thin layer chromatography (TLC, 2D TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) with the use of evaporative light scattering detector (ELSD) and mass detector (MS).

With the use of TLC, 2D TLC and TLC with adsorbent gradient, the complex of furostanol saponins in the Polish fenugreek seeds was revealed (derivatization with Ehrlich reagent). The best separation was achieved on HPTLC Si60 F₂₅₄ plates with the mixture of chloroform:methanol:formic acid (30:20:0.2, v/v/v) as the mobile phase. On the obtained TLC chromatogram 9 bands of furostanol saponins were observed.

The procedure for the quantification of diosgenin in the fenugreek seeds after acid hydrolysis was established, comprising extensive optimization of extraction, acid hydrolysis and TLC conditions (stationary phase, mobile phase, visualization reagent) and densitometric analysis. Finally, the most effective were: triple exhaustive extraction in a Soxhlet apparatus with petroleum ether, chloroform and methanol, followed by acid hydrolysis of the methanol extract with 2M aqueous sulphuric acid (temp. 80°C, 2 h). The TLC separation was performed on HPTLC Si60 F₂₅₄ plates and mobile phase n-heptane:ethyl acetate (7:3, v/v) in automatic development chamber (ADC2) at 22±2°C and 47% humidity (provided by a saturated solution of potassium thiocyanate). Obtained chromatograms were visualized by the use of modified anisaldehyde reagent. The established method was validated and applied to the estimation of diosgenin in the

fenugreek seeds from three Polish herbal companies: Lewandowski (0,12%), Kawon (0,12%) and Flos (0,13%).

The HPLC-ELSD-ESI-MS method for the qualitative analysis of steroidal saponins in methanol extract from fenugreek seeds was established. Compounds were separated on the two Discovery C-18 (150 mm x 2.1 mm x 3 μ m) columns, connected in series under gradient elution, comprising increasing concentration of ACN from 20% to 100% in 0,1% formic acid (t_G 90 minutes; stepwise-linear gradient). The resolution of the steroidal saponins complex was obtained in a form of 13 peaks.

Additionally, the analysis of ethanol extract revealed no differences in comparison to methanol extract, therefore the presence of 22-methoxy artefacts was excluded.

The use of mass detector revealed the presence of 26 steroidal saponins, 24 of which were tentatively identified as furostanol saponins according to obtained chromatographic and spectral data (t_R , m/z values) and comparison with literature data. The profiles of saponins in Polish, Turkish and African plant material were similar. The most abundant compounds were: protodioscin and trigoneoside Vb. Trigoneoside IVa and its 25-epimer glycoside F, trigoneoside Va and trigonelloside C (protoneodioscin) were present in lower concentrations. These compounds are derivatives of diosgenin (protodioscin, trigoneoside Vb, glycoside F) or yamogenin (trigonelloside C, trigoneoside IVa, trigoneoside Va), being the source of diosgenin quantified after acid hydrolysis, as 25S and 25R isomers are known to undergo the epimerisation. Therefore yamogenin may transform into diosgenin under acid hydrolysis conditions. The revealed HPLC profile of steroidal saponins varies from the HPLC and UPLC profiles of fenugreek seeds, described in literature.

Next, the established quantitative HPLC-ELSD was validated. Total amount of saponins, calculated as protodioscin, was estimated in extracts: alcohol-aqueous (135.157 \pm 4.74 μ g), aqueous (63.134 \pm 8.14 μ g) and the fraction from methanol extract (163.182 \pm 11.03 μ g) from the plant material of Polish origin. Additionally, the amount of saponins in Turkish and African fenugreek seeds was calculated (0.20%).

The evaluation of biological activity of analyzed fenugreek seeds of Polish origin was performed in the field of cytotoxic and antimicrobial activity. The different extract from the plant materials were examined: alcohol-aqueous, aqueous, methanol and the

fraction from methanol extract, as well as selected C-glycosylflavones, steroidal sapogenins and alkaloids.

The cytotoxic activity was evaluated against three human cell lines: cervical cancer HeLa, ovarian carcinoma SKOV-3, lymphoblastic leukemia MOLT-4 and control cell line of human keratinocytes HaCaT. In the experiments both MTT and RealTimexCELLigence (RTCA) system were used. The use of RTCA in the assessment of anticancer activity of *Foenugraeci Semen* was never described before.

The highest cytotoxicity was demonstrated by the fraction of methanol extract (D), for which IC₅₀ values were as follows: against HeLa 3.91 ± 0.03 µg/ml (MTT) and 3.99 ± 0.26 µg/ml (RTCA), against SKOV-3 3.97 ± 0.07 µg/ml (MTT) and 2.26 ± 0.78 µg/ml (RTCA) and against MOLT-4 7.75 ± 0.37 µg/ml (MTT). The alcohol-aqueous extract (A) revealed moderate cytotoxic activity with the IC₅₀ values: against HeLa 13.47 ± 0.62 µg/ml (MTT) and 9.65 ± 0.78 µg/ml (RTCA), against SKOV-3 10.34 ± 0.16 µg/ml (MTT) and 7.73 ± 0.1 µg/ml (RTCA) and against MOLT-4 16.18 ± 1.14 µg/ml (MTT). The weakest activity was observed for the aqueous extract, prepared in a form of infusion (B), for which obtained IC₅₀ values were : against HeLa 17.43 ± 0.3 µg/ml (MTT) and 31.45 ± 0.21 µg/ml (RTCA), against SKOV-3 16.68 ± 0.6 µg/ml (MTT) and 26.4 ± 0.71 µg/ml (RTCA) and against MOLT-4 26.55 ± 0.07 µg/ml (MTT), respectively. The methanol extract (C) was inactive.

Among the single metabolites examined, the steroidal sapogenins revealed significant activity, while C-glycosylflavones and trigonelline were inactive. These is the first report on the proapoptotic activity of yamogenin, tigogenin against all tested cell-lines and the first report on proapoptotic activity of diosgenin against SKOV-3 cell line.

The obtained IC₅₀ values for steroidal sapogenins against HeLa cell line were: yamogenin - 16.5 ± 0.59 µg/ml (MTT) and 19.6 ± 1.41 µg/ml (RTCA), diosgenin - 16.3 ± 0.26 µg/ml (MTT) and 28.0 ± 2.40 µg/ml (RTCA), tigogenin acetate 35.6 ± 3.69 µg/ml (MTT) and 25.1 ± 0.12 µg/ml (RTCA). In experiments with the use of ovarian carcinoma cell line, the steroidal sapogenins demonstrated similar activity at following IC₅₀ values: yamogenin - 16.7 ± 0.08 µg/ml (MTT) and 23.9 ± 1.48 µg/ml (RTCA); diosgenin - 19.3 ± 0.97 µg/ml (MTT) and 16.9 ± 2.89 µg/ml (RTCA); esmilagenin - 17.96 ± 1.29 µg/ml (MTT); tigogenin - 28.3 ± 3.46 µg/ml (RTCA) with activity > 50 µg/ml in MTT.

As fraction obtained from methanol extract from fenugreek seeds revealed the strongest cytotoxic activity, further investigation of its proapoptotic mechanisms was evaluated with the use of HeLa and SKOV-3 cell lines. The apoptosis rate was

calculated. In SKOV-3 cell line apoptosis rate was 50% at 10 µg concentration of fraction D, while in the HeLa cell line - 50% apoptosis rate was observed at 100 µg concentration of fraction D. The cell line SKOV-3 was more sensitive for the analyzed fraction than the HeLa cell line.

The analysis of the caspases 3 and 7 activity confirmed their involvement in the observed cancer cells death under the influence of the fraction D, which thus confirmed the induction of apoptosis in HeLa cells and SKOV-3.

The assessment of changes in mitochondrial potential in HeLa and SKOV-3 cells after 12-hour incubation with different concentrations of the fraction D revealed dose-dependent changes in mitochondrial potential in ovarian adenocarcinoma SKOV-3. It confirms the participation of the intrinsic pathway of apoptosis in tumor cell death SKOV-3 under the influence of the fraction D. In cervical cancer HeLa no changes in mitochondrial potential were observed, yet the involvement of intrinsic apoptosis pathway in the observed HeLa cells death cannot be excluded.

The results of the measurement of reactive oxygen species (ROS) revealed that after the incubation with analyzed fraction D from fenugreek seeds, the ROS level increases. This indicates the presence of oxidative stress, which can lead to the induction of caspase-12 and the intrinsic pathway of apoptosis.

The investigation on antimicrobial activity of the extracts from fenugreek seeds as well as single metabolites was performed against several bacteria strains. *Helicobacter pylori* demonstrated the highest susceptibility to extracts from the seeds of *T. foenum-graecum* at the lowest bacterial inhibitory concentration at 0.27 mg/ml for the alcohol-aqueous extract (A). The aqueous extract (B) was inactive. Obtained results suggest that in order to effectively support the therapy of peptic ulcers connected with *H. pylori* infection, it is advisable to apply alcohol-aqueous or alcohol extracts from fenugreek seeds, which possess antibacterial activity against this bacteria. Water extracts may play only a subordinate role due to their anti-inflammatory and healing properties. Among the single metabolites, vitexin was bactericidal against *H. pylori* at MBC 0.03 mg/ml, tigogenin and sarsasapogenin - at MBC 0.0625 mg/ml and diosgenin at MBC 0.125 mg/ml, while orientin demonstrated only bacteriostatic activity at MIC 0.125 mg/ml.

Established 2D LC methods may be used in the phytochemical analysis of fenugreek seeds of different origin and in C-glycosylflavones identification in other plant matrices.

Taking into account the absence of isoflavones and quantified low diosgenin content, *Foenugraeci Semen* of Polish origin seems to be a more secure plant material in comparison to fenugreek seeds of Asian origin, regarding its potential effects on the human sex hormones.