

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PETRA BUKOVEC

**IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA STEROLOV
IZ ILIRSKEGA GRAHOVCA (*Astragalus illyricus* Bernh.)**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF STEROLS FROM
ASTRAGALUS ILLYRICUS Bernh.**

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Andreja Umeka, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Damjana Janeša, mag. farm. Poskuse smo izvedli v študentskem in diplomantskem laboratoriju Katedre za farmacevtsko biologijo. HPLC analizo smo naredili na Katedri za klinično biokemijo. Masne spektre so posneli na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Andreju Umku, mag. farm., ki me je vodil pri delu, in somentorju asist. dr. Damjanu Janešu, mag. farm., ter tehničnemu sodelavcu Boštjanu Kalamaru, mag. farm., za tehnično in strokovno pomoč ter vso moralno podporo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Andreja Umka, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

VSEBINA

1	<u>UVOD.....</u>	6
1.1	PREDSTAVITEV RODU IN VRSTE	6
1.2	STEROLI.....	10
1.2.1	POMEN FITOSTEROLOV	10
1.2.2	STRUKTURNE ZNAČILNOSTI STEROLOV	10
1.2.3	BIOSINTEZA STEROLOV	13
2	<u>NAMEN DELA.....</u>	16
3	<u>MATERIALI IN METODE.....</u>	17
3.1	MATERIALI.....	17
3.2	PRIBOR, APARATURE IN METODE	18
3.2.1	SEPARACIJA IN IDENTIFIKACIJA STEROLOV	20
3.2.1.1	Reverzno-fazna HPLC	22
3.2.1.2	Masna spektrometrija.....	24
4	<u>EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI.....</u>	27
4.1	TLC ANALIZA IZVLEČKOV RASTLINE.....	27
4.1.1	STEROLI	27
4.1.2	FLAVONOIDI.....	28
4.1.3	CIKLOARTANI	30
4.2	IZOLACIJA STEROLOV	31
4.2.1	IZOLACIJA STEROLOV IZ ZELI	32
4.2.2	IZOLACIJA STEROLOV IZ KORENINE.....	34
4.3	IDENTIFIKACIJA STEROLOV	36
4.3.1	MS STEROLOV	36
4.3.2	RP-HPLC	38
4.3.3	SEMI-PREPARATIVNA RP-HPLC	40
5	<u>RAZPRAVA.....</u>	42
6	<u>SKLEP</u>	48
7	<u>LITERATURA.....</u>	49
8	<u>PRILOGE.....</u>	52
8.1	PRILOGA 1: MS SPEKTER SA-H.	52
8.2	PRILOGA 2: MS SPEKTER SA-R.....	53
8.3	PRILOGA 3: REFERENČNI MS SPEKTER B-SITOSTEROLA.	54

POVZETEK

Astragalus illyricus Bernh. oz. ilirski grahovec je rastlina iz družine metuljnic, ki jo najdemo na majhnem območju na Primorskem. Zaradi omejenosti rastišča je njen kemizem skoraj povsem neraziskan. Za nekatere predstavnike rodu *Astragalus* je znano, da vsebujejo sterole, zato smo njihovo vsebnost raziskali tudi pri enem od slovenskih predstavnikov rodu.

Rastlinski steroli so del neumiljive lipidne frakcije in široko razširjena skupina organskih spojin. Prisotni so v hrani, v terapiji pa so uporabni predvsem za zaviranje absorpcije holesterola iz prebavil in zniževanje LDL. V rastlinah so navzoči kot gradniki membran in prekursorji za ostale steroide. Glavni predstavniki v rastlinah so β -sitosterol, stigmasterol in kampesterol.

Z digitoninsko metodo smo izolirali sterole ločeno iz posušenih korenin in posušenih nadzemnih delov ilirskega grahovca. Metanolna izvlečka korenin in nadzemnih delov, ki smo ju pripravili s trikratno zaporedno maceracijo, smo uparili do suhega in ostanka saponificirali. Neumiljivi frakciji smo ekstrahirali z dietiletom ter iz njune etanolne raztopine oborili sterole z digitoninom. Po segrevanju digitonidov v DMSO smo z *n*-heksanom ekstrahirali proste sterole, ki smo jih identificirali z masno spektrometrijo in visoko ločljivostno tekočinsko kromatografijo obratnih faz. Dokazali smo, da tako korenine kot nadzemni deli ilirskega grahovca vsebujejo skoraj sam β -sitosterol, treh drugih spojin, ki so prisotne le v sledovih, pa nismo uspeli identificirati.

SEZNAM OKRAJŠAV

AUC	– površina pod krivuljo
BSTFA	– <i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid
<i>n</i> -BuOH	– <i>n</i> -butanol, 1-butanol
DCM	– diklorometan
DMSO	– dimetilsulfoksid
EtOAc	– etilacetat
EtOH	– etanol
GC	– plinska kromatografija (gass chromatography)
RP-HPLC	– obratno-fazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (reverse-phase high performance liquid chromatography)
LB reagent	– Liebermann-Burchardov reagent
MeOH	– metanol
MF	– mobilna faza
MF1	– toluen
MF2	– etilacetat : mravljična kislina : očetna kislina : voda = 100 : 11 : 11 : 27
MF3	– DCM : MeOH : H ₂ O = 70 : 30 : 3
MF4	– DCM : MeOH = 52 : 1
MS	– masna spektrometrija (mass spectrometry)
NST/PEG	– reagent za oroševanje flavonoidov
<i>p</i>	– tlak
<i>R_f</i>	– retardacijski faktor (pri TLC)
RI	– relativna intenziteta vrhov v masnem spektru
<i>T</i>	– temperatura
TLC	– tankoplastna kromatografija (thin-layer chromatography)
TMS	– trimetilsililni derivat
TMCS	– trimetilsililklorosilan
<i>t_r</i>	– retencijski čas (pri HPLC)
UV-254 nm	– ultravijolična svetloba pri 254 nanometrih
UV-366 nm	– ultravijolična svetloba pri 366 nanometrih
VIS	– vidna svetloba

1 UVOD

1.1 PREDSTAVITEV RODU IN VRSTE

Astragalus illyricus Bernh. (sinonim *Astragalus monspessulanus* L. subsp. *illyricus* (Bernh.) Gams) oziroma ilirski grahovec je nizkorastoča rastlina s temnozelenimi, pernato-deljenimi listi in rdečevijoličnimi metuljastimi cvetovi. Korenina je običajno debela 1-2 cm in sega do 40 cm v globino. Cveti septembra in oktobra. Dobro uspeva na flišnih tleh, največkrat kar brez prsti na prepereli kamnini (1).

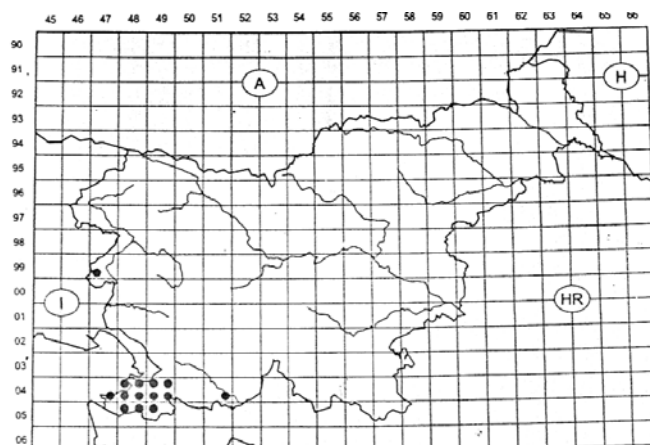


Slika 1: Ilirski grahovec med cvetenjem (4)



Slika 2: Rastlina pred cvetenjem

V Sloveniji je njeno rastišče omejeno na majhno območje na Primorskem (slika 2) (1). Najdemo ga tudi vzdolž Balkana (2, 3).



Slika 3: Rastišča ilirskega grahovca v Sloveniji (5)

Ilirski grahovec spada v rod *Astragalus*. Podrobnejša uvrstitev v rastlinski sistem (6) je prikazana v **preglednici I**.

Preglednica I: Taksonomija ilirskega grahovca (6).

Regnum (kraljestvo)	Plantae (rastline)
Phylum (deblo)	Spermatophyta (semenke)
Subphylum (poddeblo)	Magnoliophytina (kritosemenke)
Classis (razred)	Magnoliopsida (dvokaličnice)
Subclassis (podrazred)	Rosidae (roževke)
Ordo (red)	Fabales (stročnice)
Familia (družina)	Fabaceae (metuljnice)
Genus (rod)	<i>Astragalus</i> (grahovci)

V Sloveniji najdemo 11 vrst grahovca.

Preglednica II: Pojavnost vrst grahovcev v Sloveniji (6) in njihova morebitna uvrstitev glede na Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst na rdeči seznam (7).

Genus (rod)	Species (vrsta)	Oznaka na rdečem seznamu praprotnic in semenk
Astragalus	<i>Astragalus alpinus</i> L.	
	<i>Astragalus australis</i> (L.) Lam.	
	<i>Astragalus carniolicus</i> Kern.	
	<i>Astragalus cicer</i> L.	
	<i>Astragalus depressus</i> L.	R (redka)
	<i>Astragalus glycyphyllos</i> L.	
	<i>Astragalus gremlii</i> Burn.	K (premalo znana)
	<i>Astragalus hamosus</i> L.	Ex (izumrla)
	<i>Astragalus illyricus</i> Bernh.	
	<i>Astragalus onobrychis</i> L.	
	<i>Astragalus penduliflorus</i> Lam.	R (redka)

Astragalus je največji rod višjih rastlin na Zemlji, saj obsega od 2500 do 3000 vrst. Večinoma je razširjen na severni polobli ter v Južni Ameriki in je zelo prilagodljiv. Veliko vrst je endemičnih, naseljujejo obrobne habitate, kjer ostale rastline težje uspevajo. Rod je še posebej raznolik v Aziji, kjer raste več kot 2000 vrst, ter v zahodni Severni Ameriki (okoli 400 vrst).

Nekaj vrst je užitnih (*A. canadensis* L.) ali medicinsko pomembnih, nekatere vrste uporabljajo za krmo živali (*A. cicer* L.). Precej vrst jugozahodne in centralne Azije (npr. *A. gumifer*) uporabljajo za pridobivanje tragakanta.

Veliko severnoameriških vrst je strupenih tako za živino kot za divje živali. Ker se te po užitju obnašajo »noro«, se je teh rastlin prijelo ime »locoweed«, nore trave. Strupene vrste so razdeljene na 3 skupine:

- **rastline, ki proizvajajo alifatske nitrotoksine**, npr. 3-nitropropanol, in njihove glikozide (več kot 250 vrst rastlin); delujejo na CŽS, kar lahko vodi do paralize in smrti,
- **rastline, ki akumulirajo selen (selenofiti)**; selen absorbirajo iz s selenom bogate prsti, ga skladiščijo in v okolje vračajo v bolj topni obliki. Nekatere vrste (npr. *Astragalus bisulcatus*) so indikatorske rastline za odkrivanje območij, bogatih s Se,
- **rastline, ki proizvajajo alkaloid svainsonin (oz. lokoin)**; je polihidroksi-inozolidinski alkaloid, ki inhibira celične encime manozidaze, povzroči intoksikacijo, kar vodi do izgube teže, motenj gibalne funkcije, ataksije in smrti (8).

Kemijske raziskave so izvedli na posameznih vrstah. Raziskovali so npr. flavonoide, neproteinske aminokisliline, saponine, alkaloidne. Iz nadzemnih delov ali korenin so sterole izolirali iz najmanj 14 vrst (*A. alopecurus*, *A. amarus*, *A. chrysopterus*, *A. dasyanthus*, *A. eremophilus*, *A. glycophyllos*, *A. lusitanicus*, *A. membranaceous*, *A. mongholicus*, *A. pamirensis*, *A. ponticus*, *A. propinquus*, *A. pterocephalus*, *A. schachirudensis*) (9).

Taksonomija rodu *Astragalus* je kompleksna in se stalno spreminja. Steroli niso najbolj zanesljiv pokazatelj sorodstvenih povezav. Določene sterole, kot so npr. β -sitosterol,

stigmasterol in kampesterol, najdemo v zelo različnih rastlinah, tako višjih kot nižjih (β -sitosterol in stigmasterol pa tudi v raznih vrstah fitoplanktona, npr. diatomejah, cianobakterijah, kampesterol še v dinoflagelatih, diatomejah ...) (10). Tudi holesterol ni izključno živalski sterol. Bolj kot vsebujoči steroli sami je zanimivo njihovo kvantitativno razmerje, ki lahko pripomore pri identifikaciji tistih vrst grahovca, ki jih morfološko težko razlikujemo.

1.2 STEROLI

1.2.1 POMEN FITOSTEROLOV

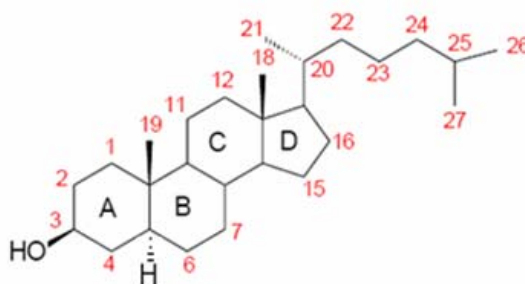
Steroli so široka skupina steroidnih spojin in so del neumljive lipidne frakcije rastlin in živali (12).

Fitosteroli so del naše vsakodnevne prehrane. Zaužijemo jih predvsem z rastlinskimi olji (posebno nerafiniranimi) iz različnih plodov ali semen. Njihova stopnja absorpcije v prebavilih je zelo nizka (2-5 %) (13).

Zavirajo absorpcijo holesterola in znižujejo LDL, delujejo protirakavo, antiaterosklerozno, protivnetno in antioksidativno (14). V praksi jih uporabljamo za znižanje krvnega holesterola že skoraj 50 let, v preventivi ateroskleroze, pri benigni hiperplazije prostate (so inhibitorji 5α -reduktaze) (11) in raka širokega črevesa (15).

1.2.2 STRUKTURNE ZNAČILNOSTI STEROLOV

Steroli spadajo v skupino steroidov s tetracikličnim ciklopenta[*a*]fenantrenskim obročnim sistemom in stransko verigo na C-17. Obroči (A, B, C, D) imajo *trans* povezavo, metilni skupini (C-18 in C-19), hidroksilna skupina (C-3) in stranska veriga imajo vse β orientacijo, zato so nad ravnino obročev. Njihova hidrogenirana oblika so stanoli (16).



Slika 4: Splošna formula 5α -holestan-3 β -ol-a

Večina naravnih sterolov ima stransko verigo s 7 do 11 ogljikovimi atomi, ki je običajno substituirana z metilno ali etilno skupino, mesta nenasičenosti znotraj policikla pa variirajo (C-5, C-7, C-8) (17). Steroli morskih organizmov se od kopenskih razlikujejo v glavnem v

stranski verigi. Stranska veriga sterolov kopenskih organizmov redko vsebuje več kot 10 C atomov, pri morskih pa je zelo pogosta veriga z 11 C atomi (18). Ta je največkrat nenasičena ali pa vsebuje ciklopropanski obroč (19).

V rastlinah prevladuje β -sitosterol, v živalih holesterol, pri glivah pa ergosterol. Nekateri steroli spužev so citotoksični (17).

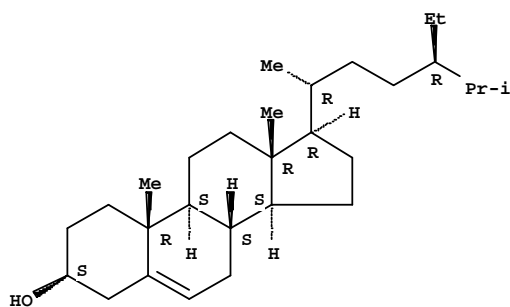
V rastlinah imajo steroli dve glavni funkciji: so strukturna komponenta membrane in biosintezni intermediati za ostale steroide. Tako v rastlinah kot v živalih stabilizirajo membrano in uravnavajo njeno fluidnost (10). Ker so amfifilni, so pomemben sestavni del vseh membran, še posebej plazemske, zunanje mitohondrijske ter membrane endoplazemskega retikuluma. Njihova struktura je toga, kar omogoča več hidrofobnih interakcij med rigidnim sterolom in ostalimi komponentami membran. To membrani zagotavlja primerno trdnost, ki se z večanjem razmerja sterol/fosfolipid povečuje. Pri rastlinah naj bi β -sitosterol in 24-metilholesterol regulirala permeabilnost membran z omejevanjem mobilnosti maščobnih acilnih verig, podobno kot holesterol pri živalih. Steroli se z glikosfingolipidi v membranah združujejo v rafte. Stigmasterol uravnava aktivnost Na^+/K^+ -ATP-aze v rastlinskih celicah, kampesterol pa je eden od rastnih hormonov rastlin (16).

V rastlinah najdemo okoli 200 različnih sterolov, njihova vsebnost in relativna razmerja se med vrstami razlikujejo. V povprečju neka rastlina vsebuje približno 70 % β -sitosterola, 20 % stigmasterola in 5 % kampesterola (16).

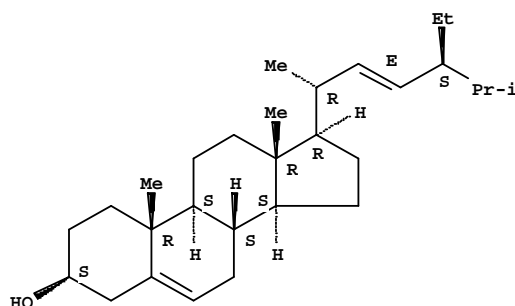
V rastlinah so prisotni tudi sterolni estri, ponavadi v približno enakih razmerjih kot pri prostih oblikah, le v nižjih količinah. Predstavljali naj bi zalogo sterolov, saj jih rastline skladiščijo v obliki maščobnih kapljic. Sterolne glikozide najdemo predvsem v listih. Običajno so na sterole z β -vezjo vezane glukoza, ksiloza ali arabinoza. Vez se vzpostavi med sladkorno OH- skupino na položaju 1 (anomerni C atom) in sterolno OH- skupino na mestu 3. Sladkorji so lahko acilirani na mestu 6 (16).

Strukture najpogostejših sterolov

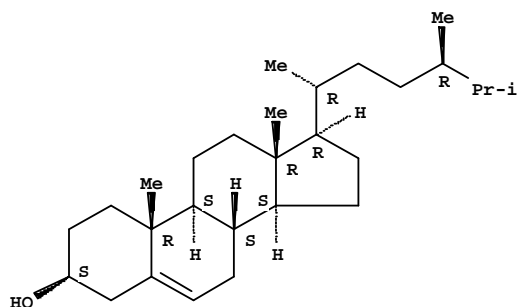
β -sitosterol



stigmasterol



kampesterol



Vse tri spojine imajo na osnovnem 5α -holestan- 3β -olskem skeletu (**slika 4**) dodatno skupino na C-24. β -sitosterol in stigmasterol imata etilno skupino, kampesterol pa metilno. Stigmasterol ima $\Delta^{22,23}$ dvojno vez, ostala dva imata nasičeno stransko verigo. Razlika med temi tremi spojinami je torej le v dolžini substituenta in $\Delta^{22,23}$ dvojni vezi.

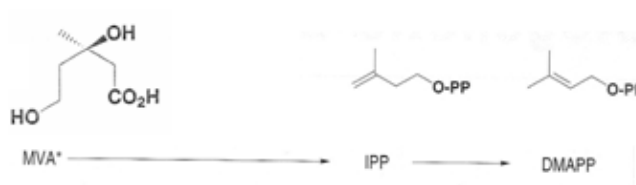
V organizmu se β -sitosterol v 60-75 % glukuronizira in v ~ 20 % metabolizira v holno ($C_{23}H_{36}(OH)_3COOH$) in henodeoksiholno kislino ($C_{23}H_{37}(OH)_2COOH$). Holna kislina se v črevesju zaradi bakterij reducira v henodeoksiholno kislino.

1.2.3 BIOSINTEZA STEROLOV

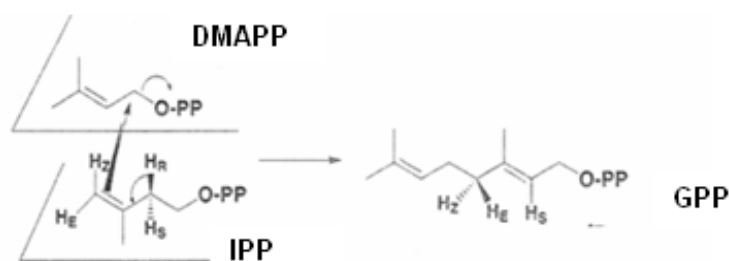
Tako steroli kot triterpeni spadajo med terpenoide, zato imajo vsaj v začetnih stopnjah skupno biosintezno pot.

Biosinteza fitosterolov je podobna kot pri holesterolu. Razlika je le v intermediatu, ki je pri biosintezi holesterola lanosterol, pri fitosterolih pa cikloartenol.

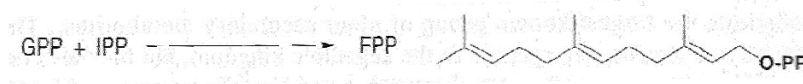
Vse stopnje v sintezi so encimsko uravnane. Osnovni gradnik za sintezo terpenov je mevalonat. Iz njega po izoprenoidni poti nastane izopentenil pirofosfat (IPP), ki encimsko izomerizira v dimetilalilpirofosfat (DMAPP) (20):



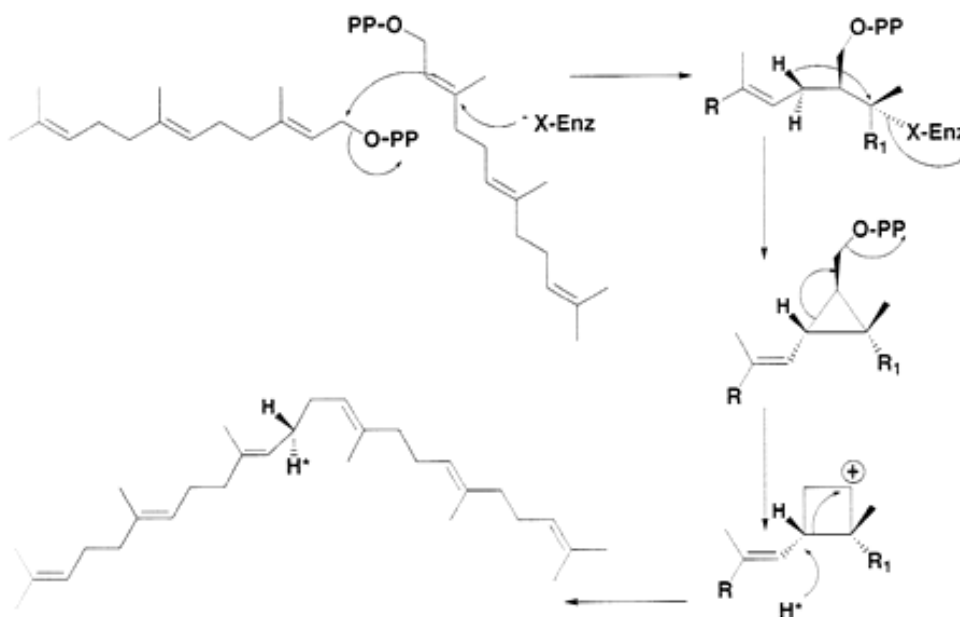
S to reakcijo se tvori reaktivna enota petih C atomov, ki je dovzetna za nukleofilni napad na C-1 in tvori povezave glava-rep. Ob povezavi IPP in DMAPP nastane geranilpirofosfat (GPP), in sicer tako, da se pirofosfatna skupina DMAPP odcepi, pri čemer omogoči stereoselektivni elektrofilni napad nastalega alilnega karbokationa na dvojno vez IPP:



Na enak način se veriga podaljša do farnezilpirofosfata:

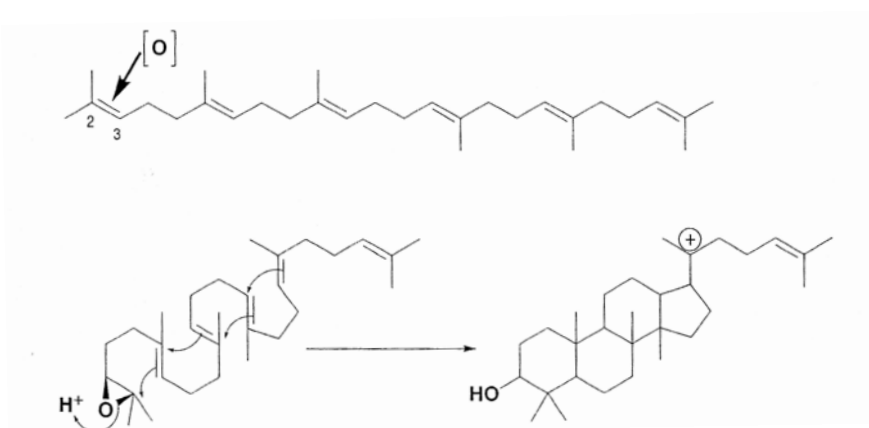


Iz FPP ob dimerizaciji v smeri rep-rep nastane skvalen. Dvojno vez C-2 - C-3 FPP alkilira druga molekula FPP, odcepi se proton, nastane ciklopropanški obroč:



Če je v mediju dovolj NADPH, se molekula prerazporedi v skvalen, najverjetneje preko ciklopropanskega karbokationa. V nasprotnem primeru se kopiči v obliki skvalenpirofosfata.

Naslednja stopnja biosinteze sterolov je oksidacija skvalena do skvalen-2,3-oksida. Ciklizacija se začne z odprtjem epoksida skvalena. Specifični encimi stabilizirajo konformacijo poliizoprena v različnih konformacijah, odvisno od tega, katera skupina spojin bo nastala. V primeru sterolov stabilizirajo skvalen-2,3-oxid v stol-kad-stol konformaciji, kar vodi do ciklizacije do prostanskega kationa:



Prostanski kation se z različnimi prenosi protonov in metilnih skupin takoj pretvori v cikloartane in kukurbitane. Sledi zmanjšanje skeleta s C₃₀ na C₂₇, poteče demetilacija,

obroč se odpre, pride do prenosa dvojne vezi, uvajajo se dodatni C atomi v stransko verigo ... Do končnih sterolov vodi več kot 30 encimsko kataliziranih stopenj, ki vse potekajo v membrani (16).

Če se skvalen epoksid uredi v konformacijo stol-stol-stol, po ciklizaciji dobimo damaranski kation, iz njega pa po vrsti pretvorb razne triterpene.

2 NAMEN DELA

Diplomsko delo je del širših raziskav ilirskega grahovca (*Astragalus illyricus* Bernh.). V okviru tega dela bomo izolirali in identificirali sterole iz zeli in korenin. Izolacijo bomo izvedli z digitoninsko metodo po postopku iz literature (21). Posušene dele rastline bomo uprašili in macerirali v metanolu. Metanolni izvleček posameznega dela rastline bomo uparili do suhega in ostanek ekstrahirali z etrom. Etrna izvlečka tako korenine kot zeli bomo uparili do suhega in ostanka saponificirali z 2 M etanolno raztopino (70 %) KOH. Neumljivi frakciji bomo ekstrahirali z etrom in ostanka po oddestiliranju etra obarjali z 1 % raztopino digitonina v 80 % etanolu. Oborino bomo centrifugirali in jo segrevali v DMSO ter tako razbili komplekse sterol-digitonin. Sproščene sterole bomo ekstrahirali z *n*-heksanom. Po odparitvi bomo dobili sterolno frakcijo, ki jo bomo po potrebi prekristalizirali iz etanola. Sterole bomo identificirali z masno spektrometrijo in RP-HPLC.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Topila

- H₂O – prečiščena voda, sistem FFA
- MeOH – metanol, p. a., (32213), Fluka, Buchs, Švica
- EtOH – etanol, 96 %, (24106), Riedel de Haën, Seelze, Nemčija
- abs. EtOH – absolutni etanol, p. a., (32221), Riedel de Haën, Seelze, Nemčija
- *n*-BuOH – *n*-butanol p. a., (33065), Riedel de Haën, Seelze, Nemčija
- EtOAc – etilacetat, p. a., (33211), Fluka, Buchs, Švica
- eter – p. a., (32203), Riedel de Haën, Seelze, Nemčija
- CH₂Cl₂ – diklorometan, p. a., (32222), Fluka, Buchs, Švica
- toluen – p. a., (32249), Fluka, Buchs, Švica
- HCOOH – mravljična kislina, p. a., (1.00264), Merck, Darmstadt, Nemčija
- H₂SO₄ – žveplova (VI) kislina, 95-97 %, p. a., (84720), Fluka, Buchs, Švica
- CH₃COOH – očetna kislina, p. a., (33209), Riedel de Haën, Seelze, Nemčija
- *n*-heksan – p. a., (32293), Riedel de Haën, Seelze, Nemčija
- MeOH (za HPLC) – metanol CHROMASOLV[®] for HPLC, (34983), Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija
- CH₃CN – acetonitril (za HPLC), (34877), Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija

Raztopine

- 70 % EtOH
- 2M KOH v MeOH

- 1 % digitonin v 80 % EtOH
- mobilne faze pri TLC:
 - DCM : MeOH v razmerjih 26 : 1 in 52 : 1
 - EtOAc : HCOOH:ledocet:voda v razmerju 100 : 11 : 11 : 27
- mobilna faza pri HPLC : acetonitril : metanol = 70 : 30 (v/v)

Trdne snovi

- digitonin – digitoninum cryst., p. a., (8530958), Merck, Darmstadt, Nemčija
- oleanolna kislina – 99 %, rotichrom[®] HPLC, (7402.1), Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
- β -sitosterol – 80 % (HPLC), (A540.1), Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
- stigmasterol – 95 %, (9468.1), Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
- Na₂SO₄ – brezvodni natrijev sulfat, p.a., (483007), Carlo Erba, Milano, Italija
- NaCl – natrijev klorid, p. a., (14451), Kemika, Zagreb, Hrvaška
- KOH – kalijev hidroksid, p. a., (1.05033), Merck, Darmstadt, Nemčija
- PEG 4000 – pract., Mr = ~ 3000-3700, n = ~ 70-80, Serva, Heidelberg, Nemčija
- β -etilaminoester difenilborne kisline – p. a., (42810), Fluka, Buchs, Švica

3.2 PRIBOR, APARATURE IN METODE

Mletje

- Waring blender, model HGBTWT, Waring, Torrington CT, ZDA

Tehtanje

- analizna tehtnica – KERN ALS 120-4, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija

Centrifugiranje

- centrifuga LC-320, Tehnica Železniki, Železniki, Slovenija

Segrevanje

- oljna kopel MST basic C – IKA-werke, Staufen, Nemčija

Raztapljanje

- ultrazvočna kadička SONIS 2 GT, Iskra PIO, d. o. o., Šentjernej, Slovenija

Odporevanje pri znižanem tlaku

- rotavapor – Büchi Rotavapor R-200, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Švica
- kopel – Büchi Heating Bath B-490, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Švica
- črpalka in nadzor – Büchi Vacuum Controller V-800, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Švica

TLC

- plošče – 10 x 20 cm, silikagel 60 F₂₅₄, debelina nanosa 0.25 mm, Merck, Darmstadt, Nemčija
- dvoprekatne kadičke – Twin Trough Chamber, 10 x 10 cm, Camag, Muttenz, Švica
- kapilare – 5 µL, kalibrirane, Camag, Muttenz, Švica
- UV detektor – Camag REPROSTAR 3, Camag, Muttenz, Švica
- grelna plošča – Camag TLC Plate Heater III, Camag, Muttenz, Švica
- avtomatski nanašalnik – Camag LINOMAT IV, Camag, Muttenz, Švica
- brizga – Camag LINOMAT, koda 695.0014, Camag, Muttenz, Švica
- orositveni reagenti:
 - **Liebermann-Burchardov reagent** - iz 5 ml acetanhidrida, 5 ml koncentrirane H₂SO₄ in 50 ml absolutnega EtOH
 - **20 % H₂SO₄ v MeOH**
 - **NST/PEG reagent** = 1 % MeOH raztopina difenilboriloksietilamina (β-etilaminoester difenilborne kisline = NST) in 5 % EtOH raztopina PEG 4000

Masna spektroskopija

- AutospecQ – Micromass, Manchester, Velika Britanija

Reverzno-fazna HPLC

- kromatografski sistem Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara CA, ZDA
- kolona Chromolith[®] Performance, RP-18e, 100 - 4,6 mm, Merck, Darmstadt, Nemčija

Semi-preparativna RP-HPLC

- kromatografski sistem Knauer (črpalki K-501, UV-detektor K-2501, vakuumski razplinjevalec), Knauer Wissenschaftliche Gerätebau, Berlin, Nemčija
- avtoinjektor MIDAS 0060.163-15, Spark Holland B.V., Emmen, Nizozemska
- kolona Chromolith[®] SemiPrep, RP-18e, 100 - 10 mm, Merck, Darmstadt, Nemčija

3.2.1 SEPARACIJA IN IDENTIFIKACIJA STEROLOV

Separacijo sterolov iz vzorca običajno izvajamo z ekstrakcijo z različnimi topili in direktno instrumentalno analizo ekstraktov.

Yang et al. (22) so sterole iz semen neke rastline izolirali tako, da so 5 g vzorca 1 minuto homogenizirali v mešalcu skupaj s 50 ml MeOH, dodali so 100 ml kloroforma in homogenizirali 2 minuti. Mešanico so filtrirali, trden preostanek pa resuspendirali v zmesi kloroform/MeOH (2 : 1, v/v, 150 ml). Homogenizirali so 3 minute, filtrirali in sprali z enakim topilom. Združene filtrate so sprali z 0,88 % NaCl_(aq) in z raztopino MeOH/H₂O (1 : 1, v/v). Topilo so odstranili pri znižanem tlaku. Lipide so umilili v 20 ml 1 M KOH v EtOH/H₂O (8 : 2, v/v) pod refluksom eno uro. Ekstrahirali so trikrat s po 40 ml etra. Etrno fazo so združili, sprali ter sušili z Na₂SO₄. Neumiljivo frakcijo so raztopili v petroletru (T_v = 60-80 °C) in nanegli na določeno kolono. Ogljikovodike so sprali s petroletr, karotenoide z zmesjo petroleter/eter (96 : 4, v/v), tokofenole in tokotrienole z zmesjo petroleter/eter (91 : 9, v/v), sterole pa z zmesjo petroleter/eter (1 : 1, v/v). Sterole so nadalje derivatizirali z BSTFA in TMCS (2 : 1, v/v) do TMS-derivatov ter izvedli GC-MS

analizo. Dobili so lepe spektre z malo šuma. Vsebnost sterolov so ovrednotili kvalitativno in kvantitativno.

Ebrahimzadeh et al. (9) so proste sterole izolirali z ekstrakcijo s petroletrom ($T_v = 40-60$ °C) v Soxhletovem aparatu, ki je trajala 10 ur. Ekstrakt so odparili in raztopili v *n*-heksanu. Tako so dobili popolni lipidni ekstrakt, ki je med drugim vseboval sterole. Derivatizacijo do TMS-derivatov so izvedli na popolnem ekstraktu in ga analizirali z GLC (gas-liquid chromatography). Dobili so relativno čiste spektre, ki pa ne pokažejo dobro sterolov, ker so prisotni v zelo nizkih količinah. Kljub temu je kakovost podatkov zadovoljiva, saj so vsebnost ovrednotili tako kvalitativno kot kvantitativno.

Nes v svojem delu (23) podaja nekatere zaključke o različnih kromatografskih in spektralnih metodah, ki jih lahko uporabljamo za identifikacijo in kvantifikacijo sterolov. Ugotavlja, da identifikacije sterolov ne moremo izvesti z eno samo metodo, čeprav NMR, še posebej ^{13}C NMR, da dovolj unikaten spekter, ki ga lahko smatramo kot "fingerprint".

Za analizo sterolov v praksi velikokrat uporabljamo plinsko kromatografijo s predhodno derivatizacijo sterolov do silanolnih etrov (9, 21) ali acetatov (24) in sklopljeno analizo GC-MS silanolnih etrov (12, 22) ali acetatov (24) ali NMR (17).

V našem primeru smo najprej pripravili metanolna izvlečka zeli in korenine. Sterole v izvlečkih smo dokazali s TLC analizo ob uporabi Liebermann-Burchardovega orositvenega reagenta. Gre za reagent, ki po segrevanju na 107 °C reagira s steroli in triterpeni (30). Sterole obarva rdečevijolično. Obarvanje je najbolj intenzivno takoj po razvitju, na zraku pa hitro zbledi.

Za izolacijo sterolov iz ilirskega grahovca smo uporabili klasično digitoninsko metodo, ki vključuje saponifikacijo in obarvanje z digitoninom. Pri identifikaciji končnih izolatov smo uporabili metodi RP-HPLC in masno spektrometrijo (MS).

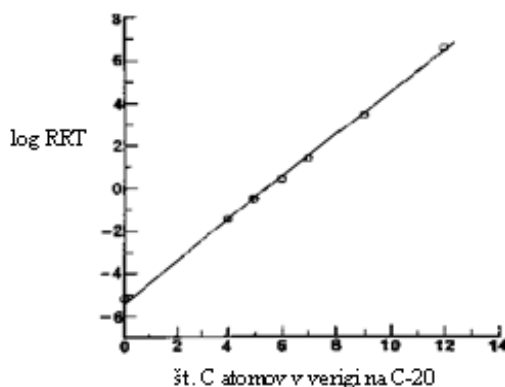
3.2.1.1 Reverzno-fazna HPLC

RP-sistemi so običajno bolj občutljivi kot normalnofazni. Več kot ima sterol OH-skupin in dvojnih vezi ter manjši, kot je, večja je njegova navidezna polarnost in manj se veže na stacionarno fazo ter se hitreje giblje (stigmasterol se od β -sitosterola razlikuje le po prisotnosti $\Delta^{22,23}$ dvojne vezi v stranski verigi, vendar to znatno skrajša retencijski čas).

RP-HPLC sistemi omogočajo ločevanje molekul z zelo majhno razliko v strukturi. Zaradi majhnih delcev ($\sim 5 \mu\text{m}$) in visoke poroznosti ima SF veliko specifično površino, kar omogoča dober stik med alkilnimi verigami in steroli ter hitro vzpostavitev ravnotežja. Efektivnost (število teoretskih podov) postopka je zato zelo velika.

Običajno je na silanolne skupine stacionarne faze pripet C_{18} fragment in s tem dobimo $-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$. C_{18} in C_8 kolone učinkovito uporabljamo za ločevanje sterolov, še posebej z mobilnimi fazami, kot so acetonitril ter mešanice acetonitrila z 10-20 % (v/v) MeOH, iPrOH ali vode.

Če na graf naneseemo katero od komponent, ki opisuje mobilnost molekule na koloni, v odvisnosti od velikosti te molekule, dobimo linearen odnos. Tak primer je npr. odvisnost logaritma relativne retencije (retencijski čas določene molekule deljen z retencijskim časom holesterola) od velikosti nerazvejane verige na C-20 (32).



Slika 5: Odvisnost logaritma relativne retencije od dolžine nerazvejane stranske verige (20R)-*n*-alkil derivatov pregn-5-en-3 β -ola (32)

Linearni odnos kaže, da vsaka CH₂- skupina zviša retencijski čas za enak odstotek. Razvejanje verige prispevek zmanjša.

Na retencijo vplivajo tudi substituenti na molekuli. Določeni fragmenti so tako ovrednoteni in opredeljeni s σ vrednostmi. Če to vrednost pomnožimo z mobilnostjo molekule brez določenega fragmenta, dobimo mobilnost molekule s tem fragmentom. σ nam hkrati poda še razmerje relativnih retencijskih časov in samih retencijski časov.

$$\sigma = k'_z / k'_{\text{brez}} = \alpha_z / \alpha_{\text{brez}} = R_{fz} / R_{f\text{brez}}$$

Pomemben vpliv na retencijo ima tudi stereokemija molekule; bolj kot je molekula sploščena, počasneje se giblje. Enako velja za večje in bolj raztegnjene molekule (32).

Vrstni red pogostih sterolov pri RP-HPLC je tako:

Δ 7-avenasterol – brasikasterol – Δ 5-avenasterol – Δ 7-kampesterol – kampesterol – stigmasterol – Δ 7-sitosterol – β -sitosterol

Separacijo so izvedli na C8 koloni, v MF acetonitril : 2-propanol : voda (2 : 1 : 1, v/v/v), pri UV-detekciji 208 nm. Vrhovi se zaradi velikega števila sterolov delno prekrivajo (32).

Furlong et al. (24) so za analizo sterolne frakcije uporabili RP-HPLC, in sicer C18 Nucleosil kolono (250 mm, 5 μ m) ter mobilno fazo etanol-metanol-voda. Ločevali so izokratsko, detektirali pa z UV-detektorjem pri 214 nm. Pri teh pogojih se stigmasterol in kampesterol nista ločila.

López-Hernández et al. (25) so sterole prav tako ločevali na C18 koloni. Kot mobilno fazo so uporabili metanol-acetonitril (30 : 70, v/v). Detektirali so pri 205 nm.

El Hattab et al. (26) so HPLC izvedli na C18 koloni in v MF 2,2,4-trimetilpentan : EtOAc = 87 : 13 (v/v).

3.2.1.2 Masna spektrometrija

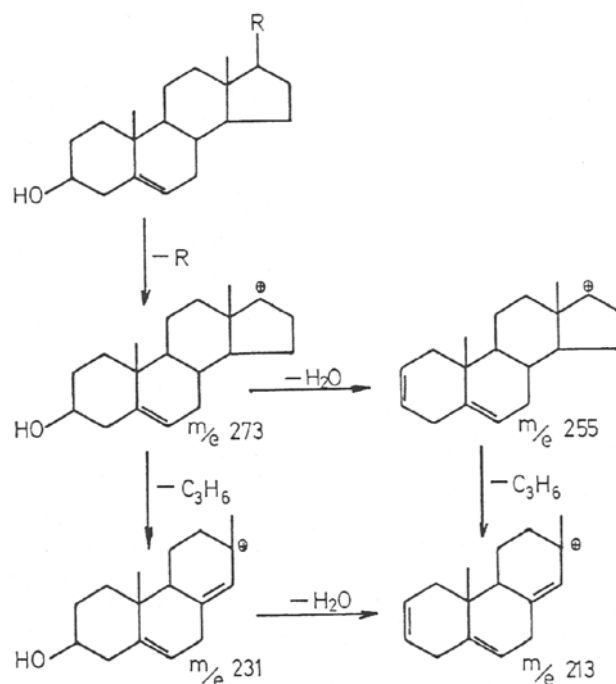
Masna spektrometrija (MS) ima dva glavna namena uporabe. Prvi je določitev molekulske mase vzorca (in pod posebnimi pogoji empirične formule). V ionskem izvoru aparata molekula (M) ionizira do M^+ , iz katerega prav tako razberemo molekulsko maso vzorca. M^+ nadalje razpade, od skupin v molekuli pa je odvisno, kako in do kakšne mere bo ta razpadla. Drugi namen MS je tako določanje strukture molekule iz dobljenega masnega spektra.

Pravila za interpretacijo spektra sterolov so zelo kompleksna, lahko pa povzamemo nekaj splošnih značilnosti.

Cepitev C-C vezi je pospešena ob višji stopnji substitucije na enem od teh atomov ali ob prisotnosti alilne dvojne vezi (t. i. χ , δ dvojne vezi, kjer sta α in β C atoma ob enojni vezi). Odcepi se fragment C-19. Pojav je pogostejši pri Δ^{5-} in Δ^8 -sterolih kot pri sterolih z Δ^7 -vezjo. Če je γ,δ -dvojna vez konjugirana, kot npr. pri $\Delta^{5,7}$, odcep C-19 poteče v večji meri. Δ^{22} -steroli hitreje izgubijo stransko verigo (s cepitvijo C-17(20) vezi) kot 22,23-dihidro analogi. Izguba stranske verige (vsaj delna) je zato pomemben pokazatelj substituiranosti stranske verige. Mesto odcepa je odvisno tudi od dvojnih vezi v steroidnem skeletu in se razlikuje od primera do primera.

Steroli (vsaj rastlinski) se največkrat razlikujejo le po stranski verigi, steroidno jedro pa imajo enako. Za identifikacijo je tako najbolj uporabna kombinacija molekulskega vrha in vrhov, specifičnih za razpad njihove stranske verige. Za 3β -hidroksi- Δ^5 -sterole so značilni vrhovi, ki ustrezajo odcepitvam metilne skupine, vode in metanola brez predhodne odcepiteve stranske verige. Tako nastanejo vrhovi pri $m/e = M^+ - 18$, $M^+ - 15$, $M^+ - 32$ in $M^+ - (15 + 18)$.

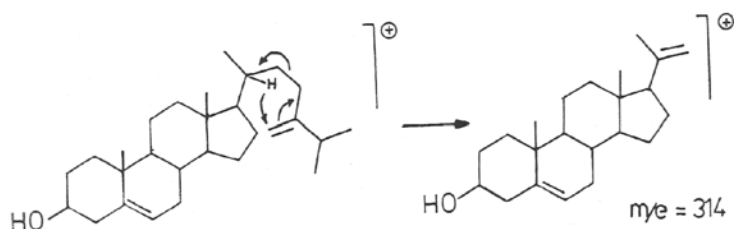
Za steroidno jedro 3β -hidroksi- Δ^5 -sterolov so značilni vrhovi pri $m/e = 273$ ($M^+ -$ stranska veriga), 255 ($M^+ -$ stranska veriga - H_2O), 231 ($M^+ -$ stranska veriga - C_3H_6) in 213 ($M^+ -$ stranska veriga - $C_3H_6 - H_2O$) (23).



Slika 6: Potek najpomembnejših fragmentacij sterolov (21)

Massey in Djerassi (19) sta ugotovila, da lahko 3β -hidroksi- Δ^5 -steroli s C-24 ali C-24 (28) nenasičeno stransko verigo razpadejo po dveh mehanizmih. Prvi je cepitev 22-23 vezi s prenosom enega vodika na nov nevtralni fragment. Proces poteče z McLaffertyjevo prerazporeditvijo, ki vključuje C-20 proton. Drugi je odcep C-17 substituenta s prenosom dveh vodikovih atomov s steroidnega skeleta. Po katerem mehanizmu bo razcep potekal, je odvisno od položaja nenasičene vezi v stranski verigi in stereokemije C-12, posledično pa od stabilnosti nastalega kationa pri fragmentaciji. To sta potrdila na primeru dezmosterola (C-24 nenasičeni) in fukosterola (C-24(28) nenasičeni).

Avtorja sta prišla do zaključka, da vrh $m/e = 314$ izvira iz McLaffertyjeve premestitve, pri kateri nastane precej stabilna spojina, ki se tvori direktno iz molekulskega iona. Fragment je pomemben le pri spojinah, ki imajo trisubstituiran C-24 atom (npr. $\Delta^{24(28)}$ nenasičeni steroli). Če te substitucije ni, prevladuje fragment $m/e 271$, ki ustreza izgubi stranske verige in dveh dodatnih vodikov. Če je vrh $m/e = 314$ prisoten, sta tako fragment kot molekularni ion prekurzorja za fragment z maso 271. Če ga ni, fragment $m/e 271$ nastane le iz molekulskega iona.



Slika 7: Potek McLaffertyjeve premestitve in nastanek fragmenta z maso 314 (21)

Pri masni spektroskopiji se za ionizacijo poslužujemo različnih tehnik, kot so elektronska ionizacija (EI), kemijska ionizacija (CI), "field" ionizacija (FI) in "field desorption" (FD) (27). Ena najnovejših tehnik je elektrorazprševalna ("electrospray") ionizacija (ESI). V preteklosti smo uporabljali skoraj izključno EI, ki je preprosta, robustna in odporna na nihanja temperature. Po drugi strani pa lahko razni strukturni elementi v molekuli (npr. heteroatomi, razvejana stranska veriga) omogočijo razpad molekule do te mere, da molekularni ion v spektru manjka ali pa ga je tako malo, da ga ne moremo ločiti od vrhov nečistot. Zato za občutljivejše molekule uporabljamo eno od drugih ionizacijskih tehnik, odvisno od narave molekule. Steroli so relativno odporni, izjema so polihidroksilirani steroidi (npr. holest-5-en-3,16,22,26-tetrol), ki ne dajo EI spektra, saj je dehidracija molekule zelo hitra in molekularni ion ni viden. V tem primeru uporabljamo FI ali FD. Sterolne estre uspešno določamo s CI z amonijevimi adukti $[M+NH_4]^+$ (28).

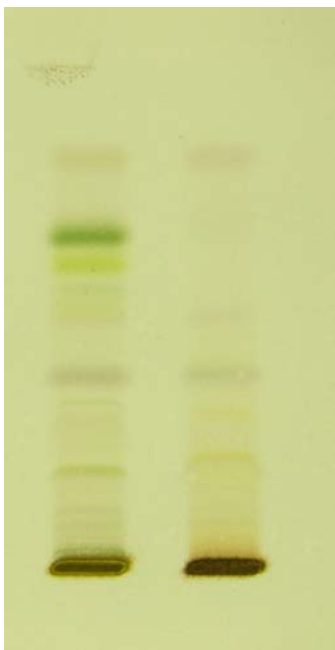
4 EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI

4.1 TLC ANALIZA IZVLEČKOV RASTLINE

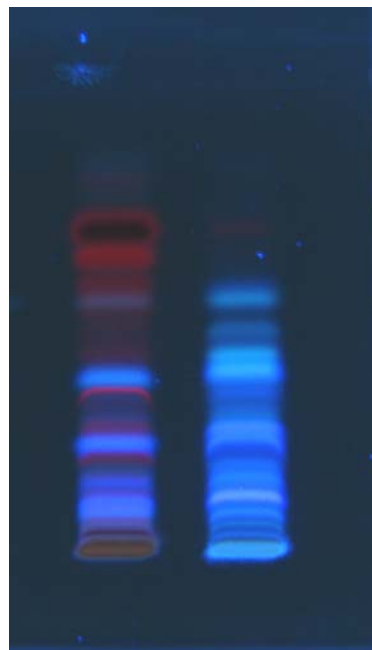
Astragalus illyricus Bernh. je zaradi omejenosti rastišč v kemijskem smislu še zelo neraziskana rastlina. Do sedaj so v njenih koreninah dokazali samo en od večih cikloartanolnih glikozidov (1). Zato smo se odločili, da uvodoma izvedemo TLC analize metanolnih izvlečkov korenin in zeli. Ugotavljali smo prisotnost sterolov, flavonoidov in cikloartanov. Na kromatografske plošče smo z avtomatskim nanašalcem nanесли ustrezne količine ekstraktov ($V = 20 \mu\text{l}$, širina nanosa = 10 mm, hitrost = 8 s/ μl).

4.1.1 STEROLI

Za mobilno fazo smo uporabili toluen. Ploščico smo orosili z LB-reagentom in jo segreti do 107 °C. Vzporedno z izvlečkoma smo kromatografirali tudi standard β -sitosterol in določili njegov R_f , ki znaša 0,37. Kot je razvidno s **slike 8**, se je v izvlečkih pojavila enako obarvana lisa, ki po R_f ustreza R_f standarda.



Slika 8: TLC kromatogram izvlečkov zeli in korenine, MF1, detekcija LB-reagent, VIS



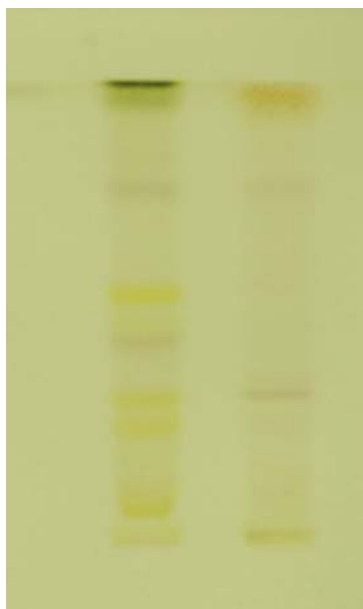
Slika 9: TLC kromatogram izvlečkov zeli in korenine, MF1, UV-366 nm

4.1.2 FLAVONOIDI

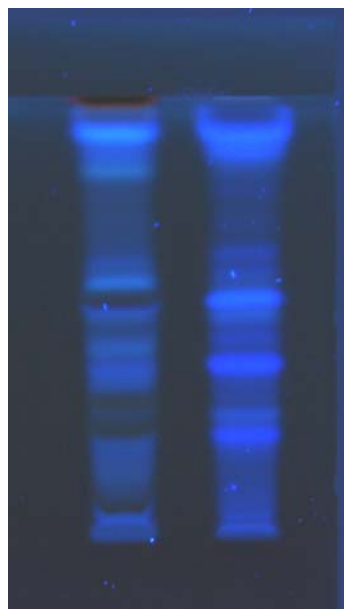
Za ločbo (30) smo uporabili MF etilacetat : mravljična kislina : ledocet : voda = 100 : 11 : 11 : 27.

Pogoji nanosa na ploščico: V = 20 μ l, širina nanosa = 10 mm, hitrost = 8 s/ μ l.

Zanimivo je, da se na istem izvlečku zeli pri približno enakih nanosih v toluenu ločijo lise z rdečo fluorescenco, pri MF za flavonoide pa se te lise zberejo na fronti, saj ima ta MF večjo polarnost in se spojine porazdelijo v območju višjih R_f . Najverjetneje ne gre za flavonoide, saj bi se v nasprotnem primeru ločili, pa tudi barva fluorescence ni običajna zanje. Modro fluorescenco pri UV-366 nm dajo lahko spremljevalne spojine flavonoidnih ekstraktov (rastlinske kisline ali kumarini). Še posebej je vidna na neorošenih ploščicah.



Slika 10: TLC kromatogram izvlečkov zeli in korenine, MF2, detekcija LB-reagent, VIS



Slika 11: TLC kromatogram izvlečkov zeli in korenine, MF2, UV-366 nm

Flavonoide lahko detektiramo direktno pri UV-254 nm, ko temnomodro fluorescirajo. Na ploščicah z indikatorjem ta fluorescenca ni opazna.

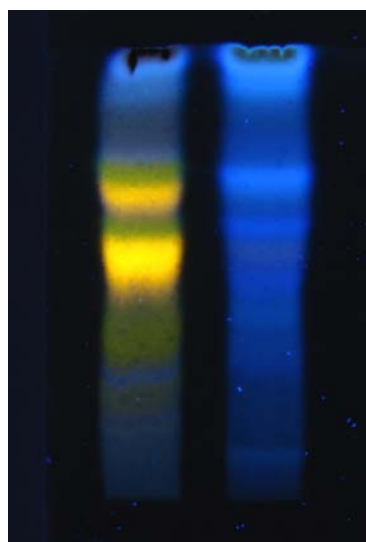
Flavonoide bolje detektiramo po orositvi z NST/PEG reagentom, ko odvisno od strukture fluorescirajo rumeno, modro ali zeleno. Fluorescenca je vidna tudi pri vidni svetlobi in

UV-254 nm, karakteristična pa pri UV-366 nm. To valovno dolžino uporabljamo tudi za identifikacijo.

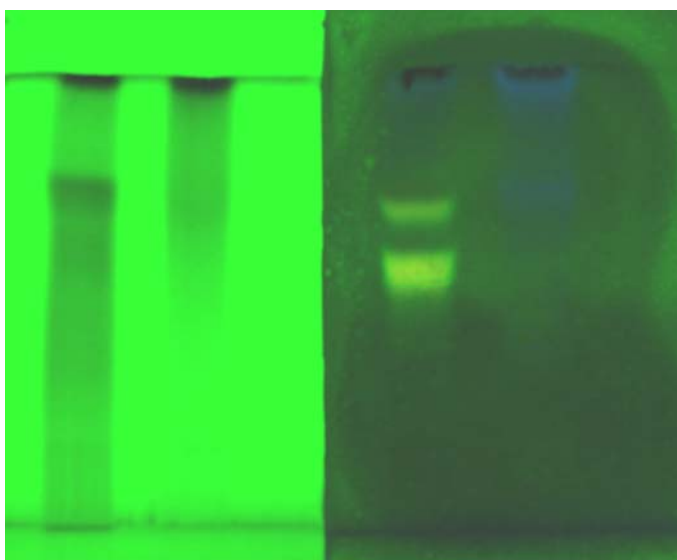
Zaporedoma orosimo z obema raztopinama reagenta. V 15 minutah se razvije fluorescenca pri UV-366 nm. PEG stabilizira kompleks ter zviša fluorescenco in detekcijo z 10 µg na 2,5 µg.



Slika 12: TLC kromatogram izvlečkov zeli in korenine, MF2, detekcija NST/PEG, VIS



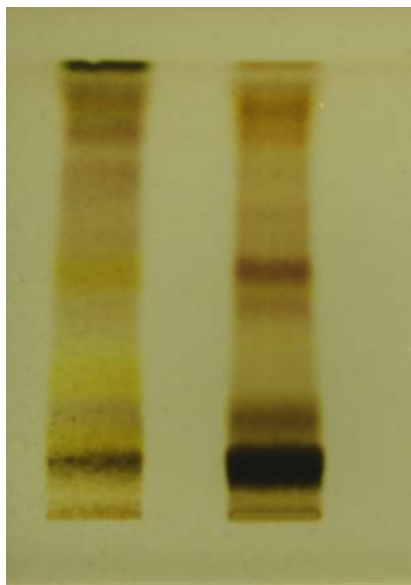
Slika 13: TLC kromatogram izvlečkov zeli in korenine, MF2, detekcija NST/PEG, UV-366 nm



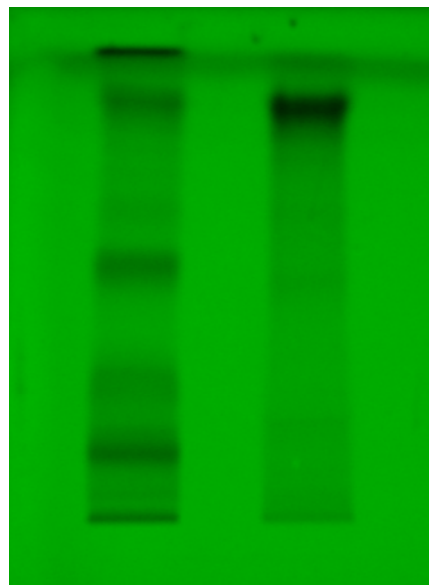
Slika 14: TLC kromatogram izvlečkov zeli in korenine, MF2, neurošeno (levo) in detekcija z NST/PEG (desno), UV-254 nm

4.1.3 CIKLOARTANI

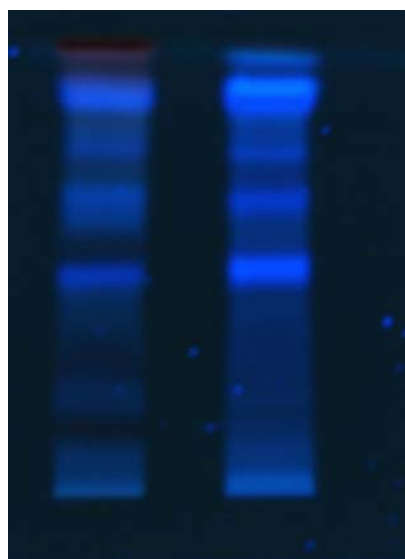
Cikloartani spadajo med triterpenske saponine. Pogoji nanosa na ploščico: $V = 20 \mu\text{l}$, širina nanosa = 10 mm, hitrost = 8 s/ μl . Ploščico smo razvijali v mobilni fazi DCM : MeOH : $\text{H}_2\text{O} = 70 : 30 : 3$ (1). Orositveni reagent je 20 % H_2SO_4 v MeOH. V VIS se po rahlem segrevanju cikloartani obarvajo rjavo. Pri 366 nm naj bi prišlo do vijoličnega obarvanja.



Slika 15: TLC kromatogram izvlečkov zeli in korenine, MF3, detekcija 20 % H_2SO_4 v MeOH, VIS



Slika 16: TLC kromatogram izvlečkov zeli in korenine, MF3, detekcija 20 % H_2SO_4 v MeOH, UV-254 nm

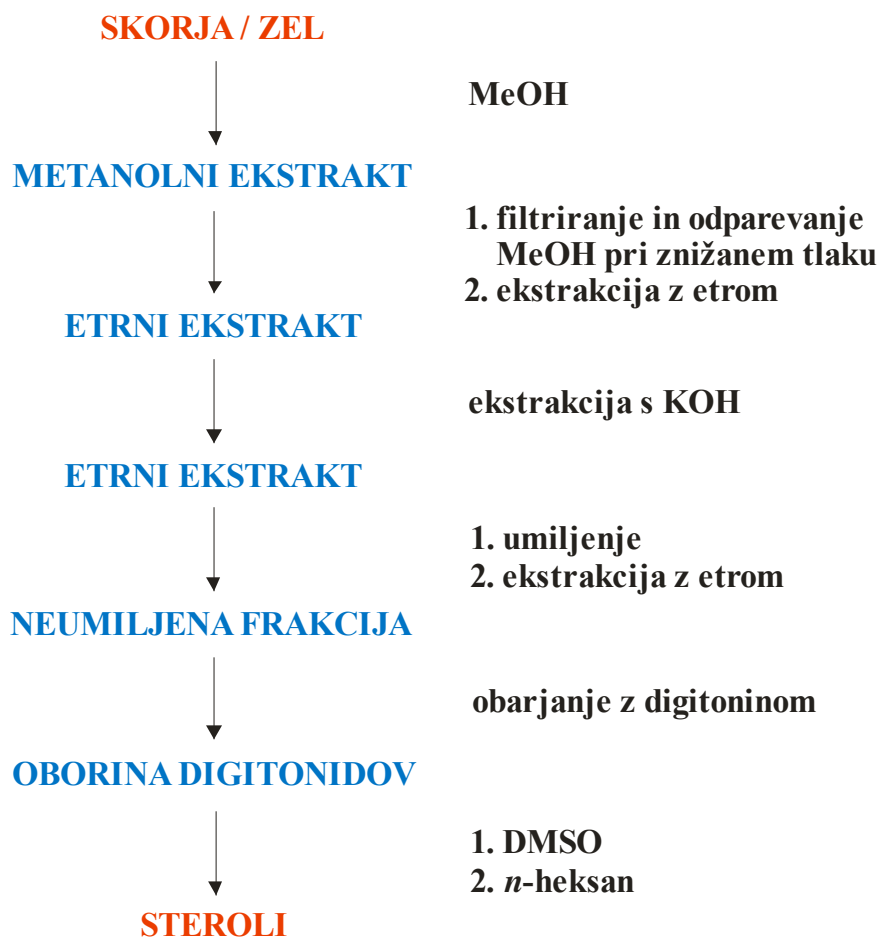


Slika 17: TLC kromatogram izvlečkov zeli in korenine, MF3, detekcija 20 % H_2SO_4 v MeOH, UV-366 nm

4.2 IZOLACIJA STEROLOV

Sterole smo izolirali po enakem postopku kot Umek (21). Rastlino smo nabrali pred cvetenjem septembra 2006 v okolici naselja Gračišče na Primorskem.

Shema izolacije



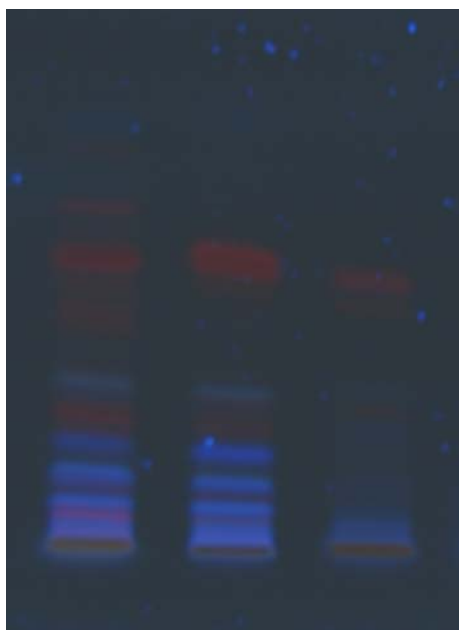
4.2.1 IZOLACIJA STEROLOV IZ ZELI

Ekstrakcija

Posušeno zel smo zmleli v mlinčku. 403 g uprašene zeli smo macerirali trikrat s po ~ 2,5 litra MeOH. Med posamezno maceracijo je preteklo vsaj 24 ur. Po vsaki maceraciji smo MeOH odparili pri 50 °C in tlaku do 240 mbar. Na koncu smo dobili 73 g gostega ekstrakta temno zelene barve. Ekstrakt smo raztopili v litru vrele destilirane vode, ohladili in ekstrahirali trikrat z 0,5 l etra, trikrat z 0,5 l etilacetata in trikrat z 0,5 l *n*-BuOH. Organske faze smo nekaj dni sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Pogoji nanosa na ploščico: V = 20 µl, širina nanosa = 10 mm, hitrost = 8 s/µl.



Slika 18: TLC MeOH/EtOAc/BuOH-izvlečkov zeli, MF4, detekcija LB-reagent, VIS



Slika 19: TLC MeOH/EtOAc/BuOH-izvlečkov zeli, MF4, UV-366 nm

Saponifikacija etrnega izvlečka

Etrni ekstrakt smo odparili pri 40 °C do 850 mbar, do suhega pa do 150 mbar. Dobili smo 7,1 g suhega ekstrakta. Suhi ostanek smo segrevali pod refluxom skupaj z 0,5 l 2 M KOH. Pri teh pogojih poteče saponifikacija. Cepimo sterolne estre in dobimo proste sterole. Te smo ekstrahirali trikrat s ~350 ml etra in sušili z Na₂SO₄. Morebitni triterpeni so ostali v alkalni fazi. Etrno fazo smo odparili pri 40 °C do 850 mbar.

Obarjanje sterolov z digitoninom

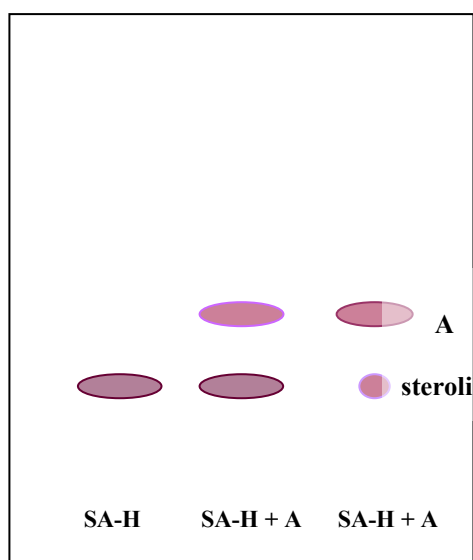
Gostemu ekstraktu smo dodali 400 ml 1 % raztopine digitonina v 80 % EtOH. V hladilniku smo pustili stati nekaj dni, da je izpadla oborina, kompleks digitonina in sterolov. Suspenzijo smo centrifugirali 10 minut pri 3500 obratih/minuto. Oborino smo sprali z EtOH in ponovno centrifugirali. Sušili smo pri 70 °C. Dobili smo 19 g digitonida.

Izolacija sterolov iz digitonida

Digitonid smo raztopili v 50 ml DMSO in na oljnem grelcu segrevali ob vrenju (130 °C) 30 minut. Kompleksi razpadejo, dobimo proste sterole. Po ohladitvi smo sterole ekstrahirali z *n*-heksanom (100 ml), ga sprali z vodo in rotavapirali pri 45 °C in tlaku do 320 mbar. Dobili smo rahlo rumenkasto substanco.

Čiščenje in prekrystalizacija sterolov

Izolat smo prečistili tako, da smo celotno količino prenesli na stekleno kolono (14 x 800 mm) in spirali z DCM. Barvila so v večini ostala na koloni. Lovili smo posamezne frakcije po 15 ml, vzorčili vsako tretjo in razvili TLC. Iz tega smo ugotovili, da imamo v vzorcu pravzaprav dve spojini. Frakcije smo združili tako, da smo dobili neznano relativno čisto spojino A (ali skupino spojin, 59 mg), sterolno frakcijo (z rahlimi primesmi spojine A, 319 mg) in zmes sterolov in spojine A (47 mg).



Slika 20: TLC končnih frakcij, dobljenih iz zeli, MF4, detekcija LB-reagent, VIS

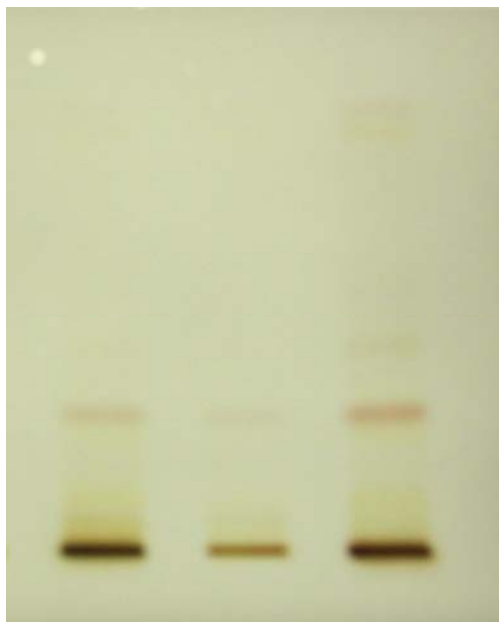
Prekristalizacijo sterolov smo naredili iz etanola. V vodni kopeli smo EtOH segreti skoraj do vrenja in nato z njim počasi raztapljali zmes sterolov. Ko se je vsa snov raztopila, smo raztopino ohladili in jo v hladilniku pustili kristalizirati nekaj dni. Nastale kristale smo filtrirali pri znižanem tlaku in posušili. Dobili smo bele svetleče igličaste kristale (249 mg). Enako smo prekristalizirali spojino A. V tem primeru so bili kristali beli, skoraj brez leska in zelo majhni (77mg).

Vsebnost sterolov v zeli ilirskega grahovca je glede na našo izolacijo 61,8 mg/100 g droge.

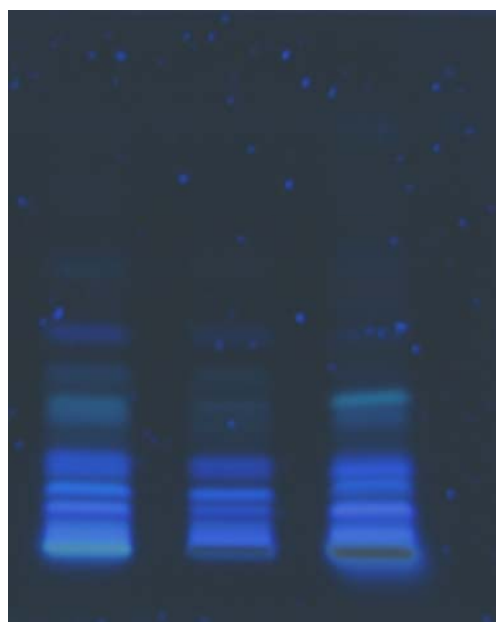
4.2.2 IZOLACIJA STEROLOV IZ KORENINE

Ekstrakcija

Drogo smo zmleli v mlinčku. 563 g uprašene korenine smo macerirali trikrat s ~3,5 l MeOH. Med posamezno maceracijo je preteklo vsaj 24 ur. Po vsaki maceraciji smo MeOH odparili pri 50 °C in tlaku do 240 mbar. Na koncu smo dobili 72 g gostega ekstrakta rjavooranžne barve. Zaradi prenasajenja se je že tvorila oborina. Ekstrakt smo raztopili v litru vrele destilirane vode, ohladili in ekstrahirali trikrat z 0,5 l etra, trikrat z 0,5 l etilacetata in trikrat z 0,5 l *n*-BuOH. Organske faze smo nekaj dni sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Pogoji nanosa na ploščico: V = 20 µl, širina nanosa = 10 mm, hitrost = 8 s/µl.



Slika 21: MeOH/EtOAc/BuOH - izvlečki korenine, MF4, detekcija LB-reagent, VIS



Slika 22: MeOH/EtOAc/BuOH-izvlečki korenine, MF4, UV-366 nm

Saponifikacija etrnega ekstrakta

Etrni ekstrakt smo odparili pri 40 °C do 850 mbar, do suhega pa do 150 mbar. Dobili smo 9,4 g suhega ekstrakta. Suhi ostanek smo segrevali pod refluxom skupaj z 0,5 l 2M KOH. Pri teh pogojih poteče saponifikacija. Cepimo sterolne estre in dobimo proste sterole. Te smo ekstrahirali trikrat s ~ 350 ml etra in organsko fazo sušili z Na₂SO₄. Morebitni triterpeni so ostali v alkalni fazi. Etrno fazo smo odparili pri 40 °C do 850 mbar.

Obarjanje sterolov z digitoninom

Gostemu ekstraktu smo dodali 400 ml 1 % raztopine digitonina v 80 % EtOH. V hladilniku smo pustili stati nekaj dni, da je izpadla oborina, kompleks digitonina in sterolov. Suspenzijo smo centrifugirali 10 minut pri 3500 obratih/minuto. Oborino smo sprali z EtOH in ponovno centrifugirali. Sušili smo pri 70 °C. Dobili smo 4,3 g digitonida.

Izolacija sterolov iz digitonida

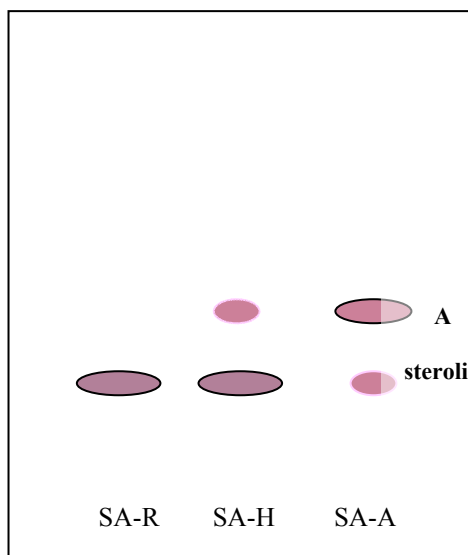
Digitonid smo raztopili v 50 ml DMSO in na oljnem grelcu segrevali ob vrenju (130 °C) 30 minut. Kompleksi razpadejo, dobimo proste sterole. Po ohladitvi smo sterole ekstrahirali z *n*-heksanom (100 ml), ga sprali z vodo in odparili pri 45 °C in tlaku do 320 mbar. Dobili smo belo snov (313 mg).

Prekristalizacija sterolov

Prekristalizacijo smo naredili iz etanola. V vodni kopeli smo EtOH segreli skoraj do vrenja in nato z njim počasi raztapljali zmes sterolov. Ko se je vsa snov raztopila, smo raztopino ohladili in v hladilniku pustili kristalizirati nekaj dni. Nastale kristale smo filtrirali pri znižanem tlaku in posušili. Dobili smo bele svetleče igličaste kristale (48 mg).

Vsebnost sterolov v korenini ilirskega grahovca je glede na našo izolacijo 8,5 mg/100 g droge.

Na koncu smo naredili TLC analizo vseh izkristaliziranih spojin. Pogoji nanosa na ploščico: V = 20 µl, širina nanosa = 10 mm, hitrost = 8 s/µl. Ugotovili smo, da imamo pri prekristalizatu korenin čisto sterolno frakcijo, pri prekristalizatu zeli pa se pojavi primes spojine A, vendar je ta prisotna v zelo nizkem obsegu. Tudi frakcija A je onečiščena s steroli.



Slika 23: TLC končnih sterolnih frakcij korenine in zeli ter neznana spojina A, MF4, detekcija LB-reagent, VIS

Te končne izolate smo dali na nadaljnjo analizo.

4.3 IDENTIFIKACIJA STEROLOV

4.3.1 MS STEROLOV

Končne prekrystalizirane frakcije sterolov smo dali na analizo na Inštitut Jožef Stefan v Ljubljani. Spektra zeli in korenine se ujemata v položaju in intenziteti vrhov, kar kaže na enako kvalitativno sestavo. Analize so pokazale, da je najbolj zastopan sterol v zmesi najverjetneje β -sitosterol, in sicer v obeh frakcijah, saj se spektra v izstopajočih vrhovih dobro ujemata z referenčnim spektrom iz baze podatkov, le intenzitete vrhov so nižje kot pri referenci. V majhnem deležu je prisoten tudi vrh z maso $m/e = 412$, kar nakazuje na možno prisotnost stigmasterola. Morebitni drugi steroli so prisotni v tako nizkih količinah, da se njihovi vrhovi izgubijo v množici vrhov tik nad bazno linijo.

Preglednica III: Vrhovi spektrov sterolnih frakcij zeli in korenine ter primerjava z β -sitosterolom.

struktura fragmenta	masa fragmenta m/e	SA-H	SA-R	β - SITOSTEROL
		RI (%)	RI (%)	RI (%)
$C_{29}H_{50}O$	414	100	100	100
$M^+ - CH_3$	396	48	48	53
$M^+ - CH_3 - H_2O$	381	33	33	41
$M^+ - C_6H_{13}$: del stranske verige	329	39	39	47
	303	51	51	70
$M^+ -$ stranska veriga	273	28	28	53
$M^+ -$ stranska veriga - H_2O	255	36	36	59
$M^+ -$ stranska veriga - C_3H_6	231	27	27	56
$M^+ -$ stranska veriga - $C_3H_6 - H_2O$	213	44	44	80

Pri SA-H in SA-R spektru je prisotnih še veliko vrhov z nižjo maso m/e. Izstopajo vrhovi z m/e 159, 145, 133, 119, 107, 95, 81 in 69.

Priloga 1: MS spekter SA-H

Priloga 2: MS spekter SA-R

Priloga 3: Referenčni MS spekter β -sitosterola

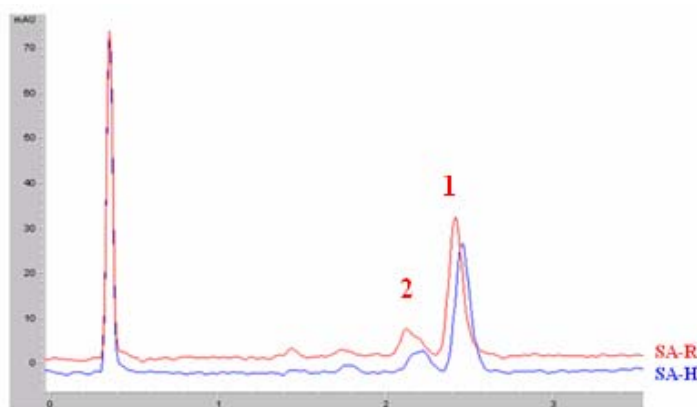
Ker smo želeli potrditi prisotnost β -sitosterola in stigmasterola, smo se odločili za RP-HPLC analizo.

4.3.2 RP-HPLC

Pripravili smo po 1 ml metanolne raztopine standardov β -sitosterola in stigmasterola s koncentracijo 0,1 mg/ml. Enako smo pripravili vzorce - sterolno frakcijo korenin in zeli. Vzorce smo pripravili s pomočjo ultrazvočne kopeli, saj se v metanolu počasi raztapljajo. Analizo smo izvedli na sistemu Agilent 1100 Series in na koloni Chromolith[®] Performance (100 - 4,6 mm). Kot mobilno fazo smo uporabili metanol-acetonitril (30 : 70, v/v) (25). Sterole smo detektirali z UV-detektorjem pri $\lambda = 200$ nm.

Pri prvem vzorcu (β -sitosterol) smo sistem še optimizirali. Ugotavljali smo ustrezen pretok, ga spreminjali med samim potekom analize, opazovali tlak v sistemu in stabilnost bazne linije, predvsem pa retencijski čas naše spojine. Ta je bil za HPLC analizo presenetljivo nizek, dobljeni podatki pa kakovostni. Vrh spojine sicer ni bil zelo oster, je pa bil zaradi razmeroma ravne bazne linije zelo izrazit. Nadaljnje analize smo izvedli pri pretoku MF 5 ml/min., tlaku okoli 5 bar in volumnu injiciranja 30 μ l.

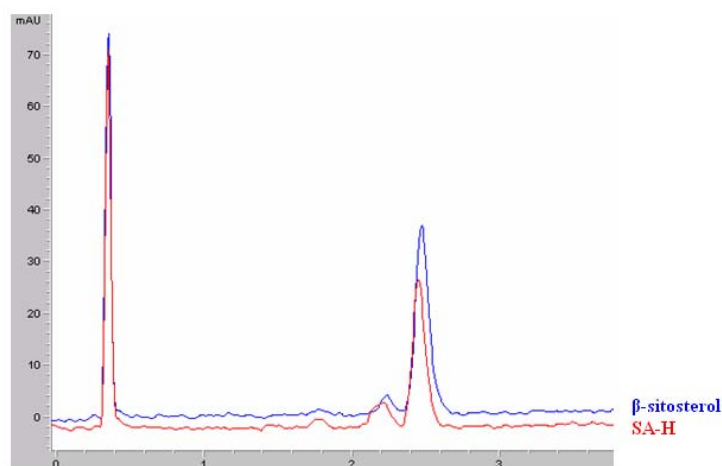
Najprej smo primerjali kromatograma SA-H in SA-R frakcij. Glede na MS analizo smo pričakovali veliko podobnost.



Slika 24: Primerjava kromatogramov SA-H in SA-R.

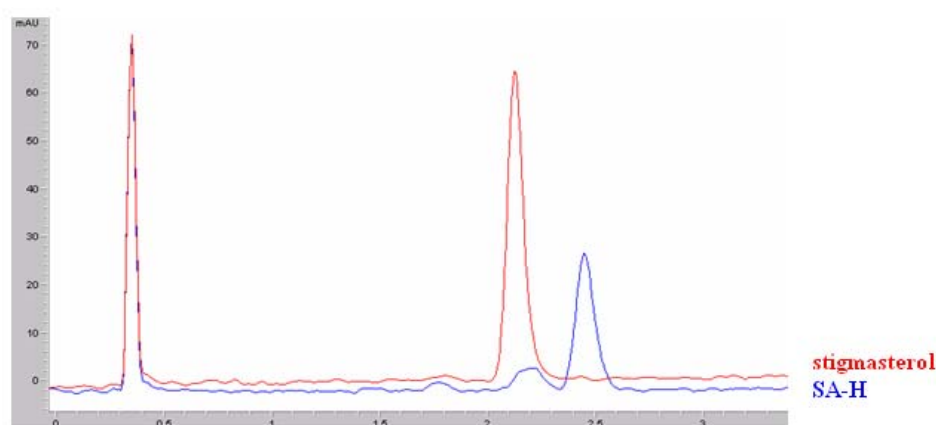
Kromatograma sta zelo podobna, malenkostna odstopanja so možna zaradi spremembe temperature med obema analizama. Sklepamo lahko na zelo veliko podobnost med profilom sterolov zeli in korenine.

Potrdili smo prisotnost β -sitosterola v sterolnih frakcijah zeli in korenin, saj se t_r v obeh primerih popolnoma prekriva z referenčnim t_r β -sitosterola (vrh 1).



Slika 25: Primerjava kromatogramov SA-H in β -sitosterola.

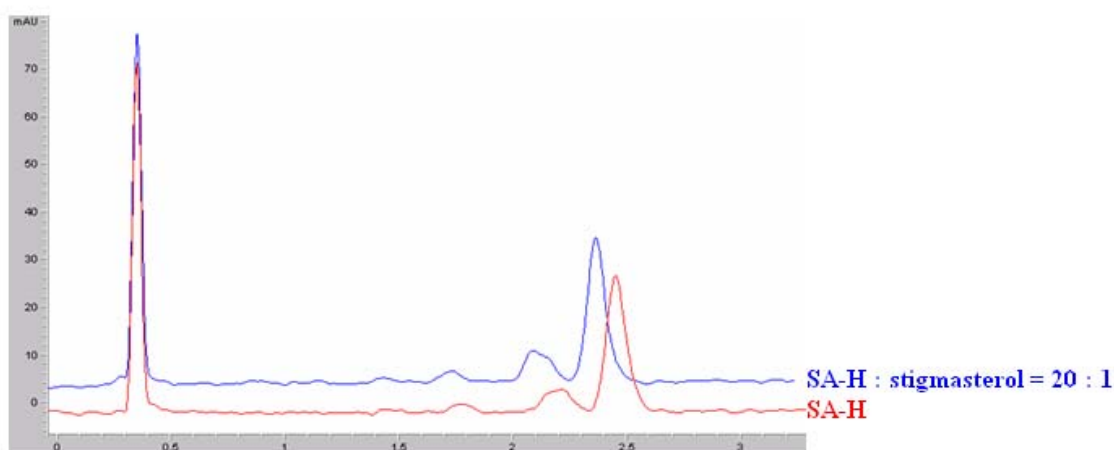
Zaradi podobnosti SA-H in SA-R smo naprej analizirali le sterolno frakcijo zeli. Kot drugi standard smo za primerjavo z SA-H uporabili stigmasterol.



Slika 26: Primerjava kromatogramov SA-H in stigmasterola.

Na prvi pogled bi sicer lahko potrdili njegovo prisotnost v vzorcih, vendar pa je bil njegov t_r malenkost nižji od t_r vrhov v analizirani zmesi (mogoče le zaradi nihanja T). Odločili smo se, da opravimo dodatne analize. Že iz samih kromatogramov je razvidna neenotnost vrha 2 pri sterolnih frakcijah zeli in korenine. Najverjetneje se v enem vrhu dejansko skrivata 2 in imamo prisotni dve spojini s skoraj identičnimi kromatografskimi lastnostmi. Želeli smo ugotoviti, ali je ena od spojin stigmasterol.

Stigmasterol smo uporabili kot interni standard. Želeli smo ugotoviti, ali se vrh domnevnega stigmasterola po dodatku le-tega zviša (sešteje) ali ne. Pripravili smo mešanice že pripravljenih raztopin (v koncentraciji 0,1 mg/ml) sterolnih frakcij in stigmasterola v volumskem razmerju 2 : 1 v korist sterolnih izvlečkov. Analizo smo opravili pod enakimi pogoji kot prejšnje. Rezultati nas niso prepričali, vrh internega standarda bi zaradi visoke koncentracije zlahka prekril celoten vrh 2, zato smo analizo izvedli še z nižjim dodatkom stigmasterola. Tudi v tem primeru je vrh standarda še prekrival vrh iskane spojine, čeprav se je že nakazovala neenotnost vrha.



Slika 27: Primerjava kromatogramov SA-H in SA-H z dodatkom stigmasterola.

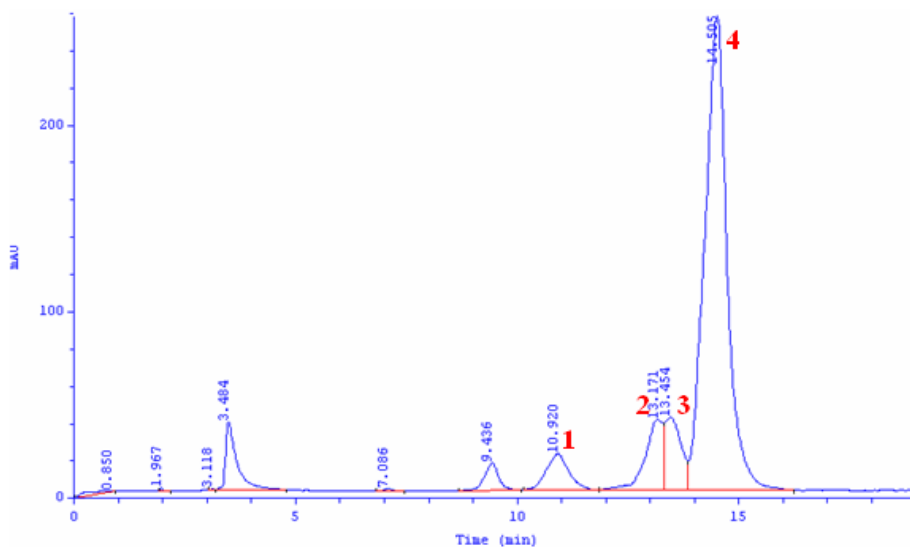
Analizo smo pri isti sestavi (SA-H : stigmasterol = 20 : 1) izvedli še enkrat, tokrat pri precej nižjem pretoku. V tem primeru se je krivulja izrazito oblikovala v dva vrha, levi vrh pa se je zvišal. Domnevamo, da bi levi vrh znotraj vrha 2 lahko bil stigmasterol. Podrobnejše rezultate bi lahko dala semi-preparativna RP-HPLC.

4.3.3 SEMI-PREPARATIVNA RP-HPLC

Ker je v kromatogramu sterolnih frakcij prisotnih več vrhov, ki jih z MS in RP-HPLC nismo uspeli identificirati, smo se odločili, da zmes s semi-preparativno kromatografijo ločimo na komponente, jih zberemo, nato pa analiziramo z MS. Analizo smo izvedli na sistemu Knauer in na koloni Chromolith[®] SemiPrep (100 - 10 mm). Kot mobilno fazo smo uporabili metanol-acetonitril (30 : 70, v/v) (25). Spojine smo detektirali z UV-detektorjem pri $\lambda = 200$ nm.

Pripravili smo po 1 ml metanolne raztopine standardov β -sitosterola in stigmasterola s koncentracijo 0,1 mg/ml. Injicirali (30 μ l) smo ju v sistem in opazovali odziv detektorja. Ker je bil ta zelo nizek in je vrh le malo odstopal od bazne linije, smo se odločili, da pripravimo čim bolj koncentrirane raztopine vzorcev. Koncentracija je znašala le 1 mg/ml, saj se steroli izredno slabo raztapljajo. Kolono smo zato obremenili do maksimalnega volumna, to je 500 μ l.

Poskusno smo nanesti vzorca SA-H in SA-R. Injicirali smo po 500 μ l. Pretok topila je bil 5 ml/min., tlak v sistemu pa 1,6-1,7 bar. Spektra sta bila skoraj identična, ločba spojina pa precej boljša kot pri RP-HPLC, zato smo naprej obravnavali le SA-H. Ugotovili smo, da je vrh 2 iz RP-HPLC analize dejansko sestavljen iz dveh vrhov.



Slika 28: Ločba SA-H na semi-preparativni koloni in oznaka frakcij za zbiranje.

Na kolono smo nanesti 500 μ l. Sistem smo prekinili takoj za detektorjem, tako da smo lahko hitro in natančno zbirali frakcije, ki so vsebovale posamezne vrhove. Postopek smo štirikrat ponovili. Frakcije smo uparili do suhega in jih analizirali z MS. Izkazalo se je, da je vrh 4 dejansko β -sitosterol, saj se spekter izolirane spojine ujema s spektrom standarda. Za ostale izolirane spojine analiza ni dala ustreznih rezultatov. Možno je, da gre za sterole, predvsem če sodimo po molekulskih masah, ki so vse okoli 412. Nemogoče je z gotovostjo reči, za katere sterole gre, saj si je veliko sterolov zelo podobnih po spektrih.

5 RAZPRAVA

Astragalus illyricus Bernh. je zaradi omejenega območja rasti precej nepoznana rastlina, zato smo najprej naredili osnovne fitokemijske analize, ki so vključevale TLC analizo sterolov in triterpenov, flavonoidov in cikloartanov.

TLC sterolov in triterpenov smo glede na literaturne podatke (21) najprej razvijali v MF toluen : etilacetat = 3 : 1 (pri tem je bil toluen zamenjava za benzen). R_f sterolov je bil precej visok, zato smo reprezentativni kromatogram razvili le v toluenu, kjer imajo steroli $R_f = 0,37$. Ločba je zelo dobra, vendar smo iskali ustrezno alternativo v kombinaciji DCM : MeOH, da bi jo uporabili pri vseh sledečih analizah. DCM : MeOH = 4 : 1 da previsok R_f sterolov, sam DCM pa prenizkega. Razmerje DCM : MeOH = 26 : 1 da malenkost visok R_f (0,41), kar je ustrezno za TLC, vendar smo kasneje večinoma delali z DCM : MeOH = 52 : 1, ker je R_f nižji in so steroli pri optimalnem območju pri $R_f = 0,30$.

Pri TLC flavonoidov smo uporabili mobilno fazo in orositveni reagent, kot ju navaja literatura (30). V nasprotju s toluenom se z MF etilacetat : mravljična ksl. : ledocet : voda = 100 : 11 : 11 : 27 dobro ločijo spojine z zelo nizkim R_f . Tako steroli potujejo s fronto in jih ne ločimo od npr. klorofila, ki ima sicer v toluenu precej višji R_f od sterolov (0,64). Na fronti se zberejo tudi spojine z rdečo fluorescenco, ki se v toluenu zelo lepo ločijo. Glede na njihovo barvo in položaj predvidevamo, da ne gre za flavonoide, saj bi se v nasprotnem primeru ločili tudi v MF za flavonoide in bi se obarvali z NST/PEG reagentom. Pri pripravi 5 % etanolne raztopine PEG 4000, ki je del reagenta, smo le-to morali segreti na 60 °C. Pri tej T se PEG 4000 stali in raztopi. Brez segrevanja se zaradi velikosti njegovih molekul raztopina ne bi tvorila. Razvili smo dva kromatograma, enega orosili z NST/PEG reagentom, drugega pa ne (oz. pri VIS smo orosili z LB reagentom). Primerjali smo ju pri VIS, UV-254 nm in UV-366 nm. Flavonoidov na neorošenih ploščah ne vidimo, po orositvi pa dobijo značilno barvo (rumeno in temnomodro). Nekateri fluorescirajo tako pri UV-254 nm kot pri UV-366 nm. Profil flavonoidov zeli je drugačen od profila korenine. Zel vsebuje flavonoide z rumeno fluorescenco, korenina pa ne. Razlikujeta se tudi v vsebnosti modro fluorescirajočih flavonoidov. Večjo raznolikost teh kaže korenina. Nekateri modre lise so vidne tudi pri UV-254 nm. Ti flavonoidi sicer fluorescirajo tudi pri UV-366 nm, vendar jih takrat težje ločimo od ostalih spojin z modro fluorescenco

(rastlinske kisline, kumarini). Te so še posebej vidne na neurošenih ploščicah. Za identifikacijo flavonoidov bi jih morali po R_f in barvi primerjati z znanimi izoliranimi flavonoidi, npr. s kalikozinom, ononinom in formononetinom, kot jih vsebuje *A. membranaceus* (33).

Kromatogram za detekcijo cikloartanov smo razvijali v zelo polarni MF (DCM : MeOH : H₂O = 70 : 30 : 3), zato je nastala dobra ločba spojin z običajno nizkim R_f . Orosili smo z 20 % H₂SO₄ v MeOH. Po rahlem segrevanju se v VIS cikloartani obarvajo rjavo, vidni so predvsem kot izrazita lisa pri $R_f = 0,13$. Prisotni so predvsem v korenini. Pri UV-366 nm naj bi prišlo do obarvanja (intenzivno rožnato-vijolično), vendar kljub ponovnemu razvijanju kromatograma pri enakem in podvojenem nanosu take barve nismo dobili. Možna razlaga je, da je bil naš nanos prenizek, kljub temu da so se pri dvojnem nanosu že delali repi zaradi prenasičenja. Pri Barbiču (1) so bili taki repi zelo opazni.

Ekstrakcija sterolov je iz obeh rastlinskih snovi potekala identično. V enem ciklusu smo zmleli približno 40 g rastlinske snovi. Mletje zeli ni predstavljalo problema. Mletje korenine je bilo težje, saj so korenine zelo debele (tudi do 2 cm) in olesenele. Postopek smo pri istem ciklusu morali večkrat ponoviti, da smo dobili zadovoljivo velikost delcev (pod 2 mm). Mletje je bilo prašno in zaradi saponinov v drogah precej dražeče.

Odparevanje pri znižanem tlaku je bilo zaradi velike količine topila (2,5-3,5 l MeOH) dolgotrajno, saj je bila koncentracija snovi v ekstraktu velika in je bilo odporevanje topila počasno. Prav zaradi gostote smo morali tlak zniževati zelo počasi, da zmes ni nenadno zavrela.

Ekstrakt smo raztapljali v vreli vodi, saj je v hladni težje topen. Še v vroči vodi se ni ves raztopil, na stenah erlenmajerice so ostali smolnati ostanki. Pred ekstrakcijo z etrom smo morali to raztopino dobro ohladiti, saj ima eter zelo nizko vrelišče in bi nam zaradi povečanega izhlapevanja lahko povzročal težave pri ekstrakciji. Pri delu z njim smo po vsakem stresanju obvezno izenačevali tlak v liju ločniku. V etru naj bi ostali predvsem steroli, v *n*-BuOH pa triterpeni. TLC kromatogram nam je pokazal, da sta si etrna in etilacetatna frakcija zelo podobni po sestavi in sposobnosti ekstrahiranja sterolov. To nam pove, da sta si topili po polarnost približno enaki (in da eter iz alkalne vodne faze ni uspel

izločiti vseh sterolov), kar nam pove tudi podatek, da so ekstrakcijo iz MeOH/DCM ekstrakta izvedli tudi s samim etilacetatom (31). *n*-Butanolni izvleček vsebuje manj snovi in predvsem manj sterolov, čeprav so tudi tu še vedno prisotni. Že pri tej stopnji smo opazili velike izgube. Ekstrahirati bi morali z večjo celokupno količino etra. Po naši oceni bi glede na intenzivnost sterolne lise v EtOAc frakciji morali uporabiti vsaj dvakratni celokupni volumen, torej skupaj približno 2 l. Tako bi izvedli šest ekstrakcij s ~ 330 ml etra. Nadaljnja ekstrakcija z EtOAc in *n*-BuOH ni smiselna, če se odločimo le za identifikacijo sterolov, ki prevladujejo v etrni fazi. Smotrna je le v primeru, če želimo optimizirati ekstrakcijo z etrom. V tem primeru z EtOAc ugotavljamo, kako uspešno je bila dejansko (na podlagi prisotnosti enakih spojin kot v etru) ekstrakcija. Ekstrakcija z EtOAc in *n*-BuOH je smiselna tudi v primeru, ko želimo iz teh ekstraktov izolirati kakšno specifično spojino ali skupino spojin. Če teh frakcij ne nameravamo obravnavati, je njihova priprava nesmiselna, saj s tem le obremenjujemo okolje z dodatnimi odpadnimi topili.

Frakcije smo sušili z Na₂SO₄, saj se vsa naša topila v določeni meri mešajo z vodo. Če vode ne odstranimo v celoti, pride do težav pri odparevanju topila pri znižanem tlaku. Eter zelo hitro hlapi, voda pa ne. Da jo odstranimo, moramo zvišati T in znižati p, kar pa lahko vpliva na termolabilne komponente ekstrakta. Vodo lažje odstranimo tako, da z abs. EtOH tvorimo evtektično zmes, 96 % EtOH, ki hlapi pri nižji temperaturi.

Ob segrevanju z 2 M metanolno raztopino KOH poteče umiljenje. Gre za cepitev sterolnih estrov in sprostitvev prostih sterolov. Zaradi nadaljnje obravnave je stopnja pomembna, saj komplekse z digitoninom tvorijo le prosti steroli. Za večji izkoristek stopnje bi lahko umiljenje nadomestili s preestrenjem (34). Oba omogočata sprostitvev sterolnih estrov in njihovo določitev v prosti obliki. Preestrenje je dobra alternativa običajnemu umiljenju, saj je enostavno ter se z njim izognemo nadležni ekstrakciji neumiljive frakcije in je zato bolj prijazno okolju. Sterole smo ekstrahirali z etrom, triterpeni pa so ostali v alkalni fazi. Tokrat etra nismo sušili, zato smo pri milih pogojih po rotavapiranju dobili gosti ekstrakt.

Proste sterole smo obarjali z digitoninom. Kompleks izpade v nekaj dneh. Dobili smo belo oborino, ki smo jo odcentrifugirali, sprali in sušili. Sledilo je segrevanje v DMSO,

kompleksi so razpadli, ponovno smo dobimo proste sterole. Ekstrahirali smo jih z *n*-heksanom.

Sterolna frakcija korenine je glede na TLC in tudi vizualno precej čista, frakcija zeli pa še vedno vsebuje veliko rumenih barvil, poleg tega pa še spojino A. Glede na izkušnje pri TLC, ko pri večjem deležu DCM na ploščici ostane več barvil pri nizkih R_f in se torej barvila slabše porazdeljujejo, smo to frakcijo nanесли na običajno stekleno kolono in spirali s čistim DCM. Večina obarvanih snovi je ostala na koloni, ločili pa smo frakciji A in sterolno frakcijo. Vse frakcije smo prekrystalizirali, in sicer tako, da smo posušene frakcije raztopili v minimalni količini vročega EtOH in pustili v hladilniku kristalizirati nekaj dni. Nastale kristale smo filtrirali pri znižanem tlaku, matično lužnico pa smo ponovno postavili v hladilnik. Izpadlo je še precej kristalov. Kristali sterolov so beli, bleščeči in igličasti. Kristali spojine A so majhni, imajo zelo malo leska.

Vsebnost sterolov, ki smo jo določili v zeli in korenini, ni dejanski pokazatelj kvantitativne vsebnosti. Če bi to želeli, bi morali kromatografirati prvotni metanolni izvleček, kar bi bilo zaradi velikega števila raznolikih komponent v njem zelo težavno. Točnost rezultatov bi bila zaradi relativno nizke vsebnosti sterolov vprašljiva. Kljub temu lahko komentiramo našo metodo z vidika izkoristka. Izgube med procesom so velike, saj je tudi število stopenj visoko, nobena pa nima 100 % izkoristka. Če bi naslednjič spet uporabili to metodo, bi jo morali predhodno optimirati, še posebej vrsto in količino uporabljenih topil.

Identifikacijo sterolov smo izvedli z MS in HPLC ob UV detekciji. MS je pokazala, da v ilirskem grahovcu prevladuje najverjetneje β -sitosterol. Vrhovi referenčnega spektra β -sitosterola se popolnoma pokrijejo s spektroma sterolnih frakcij, intenzitete vrhov SA-H in SA-R pa so nižje kot intenzitete vrhov standarda. Poleg teh vrhov le-ta vsebujta tudi množico drugih vrhov, kar kaže na to, da so v zmesi prisotni tudi drugi steroli, vendar v manjši količini. Med njimi je opazen vrh z maso m/e 412, vendar v zelo nizki intenziteti. To bi lahko kazalo na prisotnost stigmasterola. Nekateri vrhovi se včasih kar izgubijo med vrhovi nečistot in niso preveč izraziti. Z nadaljnjo analizo smo hoteli preveriti prisotnost β -sitosterola in stigmasterola.

HPLC analiza je potekala izredno hitro, ločba vrhov pa je bila dobra. Vrhovi spojin sicer niso bili zelo ostri, so pa bili zaradi popolnoma ravne bazne linije zelo izraziti. Najprej smo kolono spirali z MF tako dolgo, da se je bazna linija ustalila. Injicirali smo raztopino β -sitosterola in optimizirali analizo. Najprej smo izbrali najustreznejšo λ , kjer je imel sterol najvišji odziv. Začetni volumen vzorca je kljub temu dal precej nizko AUC, zato smo volumen potrojili. Pri pretoku 1 ml/min. je bil vrh tudi precej razširjen, tlak v koloni pa nizek in nekajkrat manjši od kritičnega p. Odločili smo se, da pretok dvignemo na 5 ml/min. Pri tem p ni presegel mejne vrednosti, vrh β -sitosterola pa je bil lepo ozek.

Zaporedno smo injicirali β -sitosterol, SA-H, stigmasterol in SA-R. Profila SA-H in SA-R sta identična oz. le malenkost odstopata. Injiciranje standarda β -sitosterola je pokazalo, da je ta precej nečist, glede na specifikacijo je 80 % čist, čeprav je namenjen za HPLC. Glavni vrh (vrh 1) spektra je β -sitosterol. Tako smo tudi s HPLC analizo potrdili, da je glavni sterol v zmesi β -sitosterol. Kromatograma zeli in rastline kažeta podobne vrhove, glavni vrhovi pri vseh pa se ujemajo. Opazna je neenotnost vrha 2. Najverjetneje se v njem skrivata dva vrhova. Preverili smo, če je kateri od njiju stigmasterol.

Stigmasterol smo injicirali kot standard. Na prvi pogled se zdi, da glede na t_r ustreza enemu od vrhov v naših izolatih, vendar ne popolnoma. Možno je odstopanje zaradi nihanja temperature. Poleg tega so t_r precej nizki (2-2,5 min.) in so odstopi toliko bolj opazni. Odločili smo se za dodatno analizo, in sicer smo zmešali raztopini SA-H in stigmasterol v volumskem razmerju 2 : 1. Še vedno nismo mogli razbrati, ali gre za stigmasterol ali ne, saj je bila koncentracija stigmasterola tako visoka, da je prekrila manjši vrh neznanega sterola. Enako smo obravnavali SA-R. Analiza je dala enake rezultate, zato smo pripravili še raztopino SA-H in stigmasterola v razmerju 20 : 1. Tokrat je bila koncentracija stigmasterola tako nizka, da ni prekrila sosednjega vrha. Levi del vrha 2 se je zvišal, kot da bi se seštel koncentraciji stigmasterola v SA-H in standardu. Ko smo pretok zmanjšali na 2 ml/min, se je t_r povečal, vrhova pa sta se še bolj razširila, ločba je bila boljša. Neenotnost je jasno vidna. Spojina bi lahko bila stigmasterol, druga spojina v vrhu 2 pa bi glede na t_r in sodeč po literaturnih podatkih (32) lahko bil Δ^7 -sitosterol.

Da bi ugotovili, kateri steroli so dejansko prisotni v naših izolatih, smo morali izvesti še semi-preparativno HPLC analizo, zbrati posamezne frakcije in jih ločeno analizirati z MS. Tako bi našo rastlino z vidika sterolov res lahko kakovostno ovrednotili.

Pri semi-preparativni kromatografiji je bila ločba dobra. Ker je kapaciteta kolone velika, smo nanjo lahko injicirali več vzorca. Eksperiment smo ponovili štirikrat, tako da smo po odparevanju topila dobili zadostno količino posameznega vzorca. Ločitev je bila dobra, vrhovi so bili skoraj popolnoma čisti, le vrh 3 je vseboval komaj zaznavno količino snovi 2, vrh 4 pa malo spojine 3.

Ločene spojine 1, 2, 3 in 4 smo dali na MS analizo. Ta je potrdila, da je spojina 4 dejansko β -sitosterol. Za ostale spojine nismo dobili točnih rezultatov. Tako spojina 2 kot 3 imata enako maso (412,37). Ker je takih spojin zelo veliko, razlike med spektri pa zelo majhne, je skoraj nemogoče z gotovostjo trditi, za katero spojino gre. Najverjetneje pa so vse spojine steroli.

V izvlečku zeli imamo prisotno tudi spojino A. Ta nastane s hidrolizo med stopnjo saponifikacije, ki sicer poteka v alkalnem, vendar so pogoji dovolj ostri in postopek dovolj dolgotrajen, da poteče ireverzibilna hidroliza do spojine A.

Ločili smo jo od sterolne frakcije zeli in jo poslali na MS analizo, vendar ni dala ustreznih rezultatov. Opazili smo, da spojina pri UV-366 nm fluorescira od modro do rahlo vijolično, kar nakazuje na to, da vsebuje precej močan kromofor. Barva se tudi z LB-reagentom, torej najverjetneje vsebuje podobne strukturne elemente kot steroli in triterpeni. Glede na R_f je polarnejša od sterolov (ima višji R_f). Za podrobnejše rezultate bi morali opraviti dodatno analizo, npr. NMR.

6 SKLEP

Zaradi funkcijske vrednosti so steroli pomembna komponenta rastlin. Za človeka imajo terapevtski pomen, predvsem glede vpliva na nivo holesterola v krvi. Z vidika uporabnosti je primerno, da vire z visoko vsebnostjo sterolov identificiramo ter kvalitativno in kvantitativno ovrednotimo, saj lahko tako najdemo kakšnega, ki nam bo v pomoč pri preventivi.

Dosegli smo cilj diplomskega dela. Dokazali smo, da ilirski grahovec (*Astragalus illyricus* Bernh.) vsebuje znatno količino sterolov, in sicer v zeli 61,8 mg/100 g suhe snovi in v korenini 8,5 mg/100 g droge (pri obeh prevladuje β -sitosterol). To pa je manj kot pri soji, ki v zrnih vsebuje do 84,3 mg sterolov/100 g zrn (35). Kljub temu ima ilirski grahovec relativno visoko vsebnost, a bi bil zaradi omejenega rastišča neprimeren za morebitno široko uporabo. Način izolacije sterolov je bil za kvalitativno delo ustrezen, za kvantitativno pa premalo racionalen, vsebnost sterolov je le okvirna in ni dovolj kakovosten podatek. Vsebnosti tudi nismo določali v prvotnem ekstraktu. Pokazali smo tudi, da so v ilirskem grahovcu tudi cikloartani in flavonoidi. Cikloartani so bili že deležni delne obravnave (1), flavonoidi pa so še neraziskano področje.

Med predstavniki rodu *Astragalus* je bil do sedaj največ pozornosti deležen *Astragalus membranaceus* in njegova korenina, predvsem v povezavi z modulacijo imunskega sistema (33). Vsebuje triterpenske saponine (cikloartani), flavonoide, fitosterole ... Polisaharidi zvišujejo aktivnost mediatorjev, ki se borijo proti tujkom, in znižajo količino vnetnih snovi. Flavonoidi pospešujejo proliferacijo T-limfocitov in višajo celokupno število limfocitov. Saponini so uspešni pri kardiovaskularnih boleznih, inhibirajo tvorbo lipidne peroksidaze v miokardu in znižujejo koagulacijo krvi. Vse tri skupine spojin poleg tega še zmanjšujejo oksidacijske poškodbe membran.

Rod *Astragalus* je izjemno velik, vendar zaradi sorodstvene povezave podobnosti v vsebnosti spojin med njegovimi vrstami obstajajo, tako da je terapevtsko potrjene skupine spojin pri *A. membranaceus* in ostalih že raziskanih predstavnikih tega rodu smiselno raziskati tudi pri domačih vrstah grahovca. Prihodnjim raziskovalcem tega področja tako ostajajo najmanj flavonoidi in polisaharidi.

7 LITERATURA

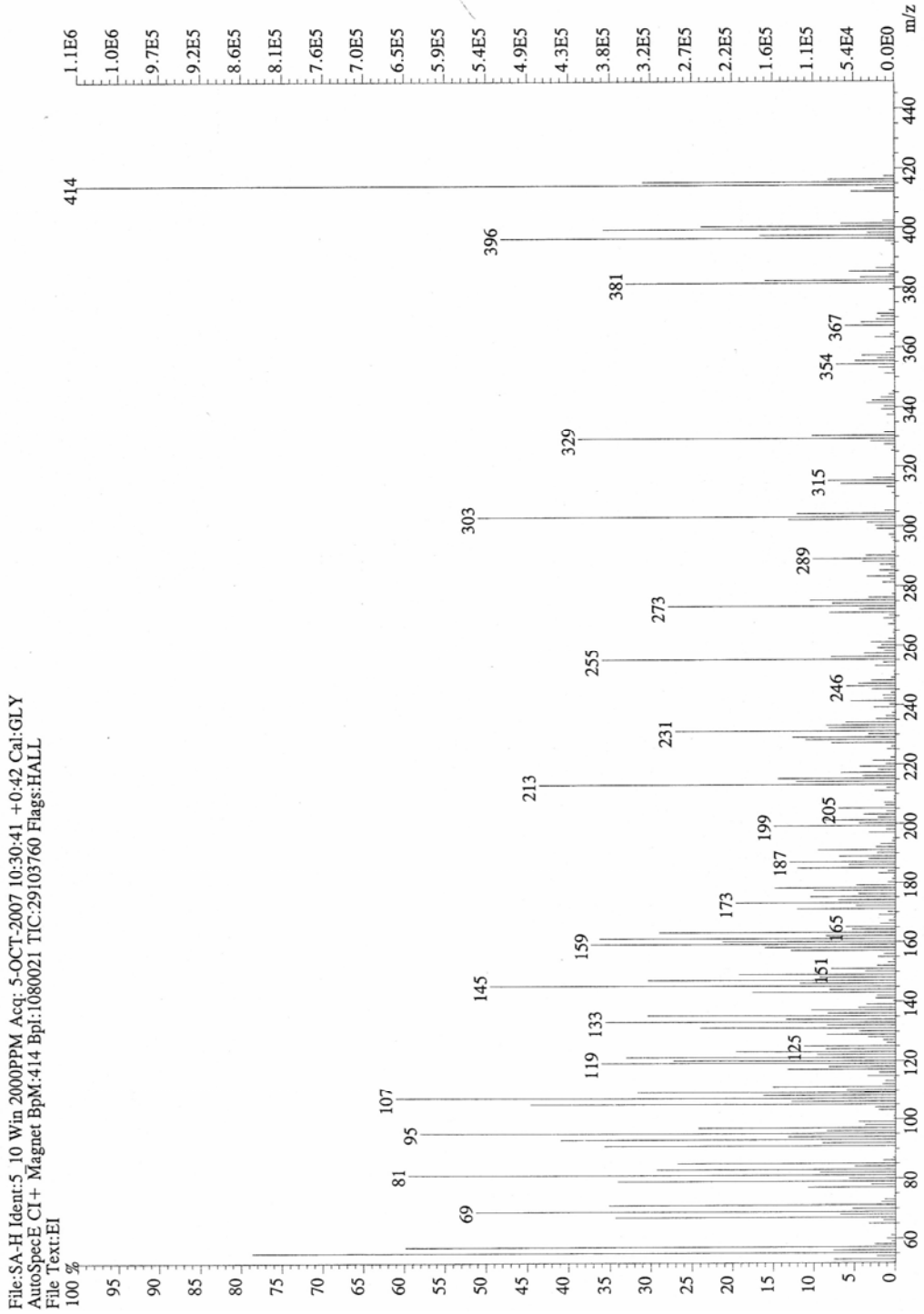
1. Barbič M. *Diplomska naloga - Izolacija in identifikacija triterpenskih glikozidov cikloartanskega tipa iz vrste Astragalus illyricus*. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2006: 8, 24.
2. <http://hirc.botanic.hr/fcd/DetailFrame.aspx?IdVrste=1518>, 19. 02. 2008
3. <http://nparkovi.cg.yu/eng/skad/flora.htm>, 19. 02. 2008
4. http://www.volovjareber.si/flora/pic/ilirski_grahovec-astragalus_illyricus.jpg, 10. 03. 2008
5. Jogan N. *Gradivo za Atlas flore Slovenije*. Center za kartografijo favne in flore, Miklavž na Dravskem polju, 2001: 55.
6. Martinčič A, Wraber T, Jogan N, Ravnik V, Podobnik A, Turk B, Vreš B. *Mala flora Slovenije*. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1999: 272-274.
7. *Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam*. Uradni list RS 82/2002, letnik XII, 82: 8893-8975.
8. http://loco.biosci.arizona.edu/astragalus/astragalus_home.htm, 19. 02. 2008
9. Ebrahimzadeh H, Niknam V, Maassoumi AA. *The sterols of Astragalus species from Iran: GLC separation and quantification*. *Biochem Sys Ecol* 2001; 29: 393-404.
10. http://osfl.gmu.edu/~gfoster/research/Sterols/Sterol_Potomac%20March2004.doc, 19. 02. 2008
11. Schulz V, Haensel R, Tyler VE. *Rational Phytotherapy*. Springer, Berlin, Nemčija, 2001: 277.
12. Yang B, Koponen J, Tahvonen R, Kallio H. *Plant sterols in seeds of two species of Vaccinium (V. myrtillus and V. vitis-idaea) naturally distributed in Finland*. *Eur Food Res Technol* 2003; 216: 34-38.
13. Berger A, Jones PJH, Abumweis SS. *Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients*. *Lipids in Health and Disease* 2004; 3: 1-19.
14. Vaikousi H, Lazaridou A, Biliaderis CG, Zawistowski J. *Phase Transition, Solubility, and Crystallization Kinetics of Phytosterols and Phytosterol-Oil Blends*. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 1790-1798.

15. Nair VDP, Kanfer I, Hoogmartens J. *Determination of stigmasterol, β -sitosterol and stigmastanol in oral dosage forms using high performance liquid chromatography with evaporative light scatterin detector.* J Pharm Biom Anal 2006; 41: 731-737.
16. http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/plant_st/index.htm, 19. 02. 2008
17. Mansoor TA, Lee YM, Hong J, Lee C-O, Im KS, Jung JH. *5,6:8,9-Diepoxy and Other Cytotoxic Sterols from the Marine Sponge Homaxinella sp.* J Nat Prod 2006; 69: 131-134.
18. Li LN, Sjöstrand U, Djerassi C. *Minor and Trace Sterols in Marine Invertebrates. 27. Isolation, Structure Elucidation, and Partial Synthesis of 25-Methylxesterol, a New Sterol Arising from Quadruple Biomethylation in the Side Chain.* J Org Chem 1981; 46: 3867-3870.
19. Massey IJ, Djerassi C. *Structural and Stereochemical Applications of Mass Spectrometry in the Marine Sterol Field. Synthesis and Electron Impact Induced Mass Spectral Fragmentation of Δ^{24} - and $\Delta^{24(28)}$ - 3β -Hydroxy- Δ^5 -sterols.* J Org Chem 1979; 44: 2448-2456.
20. Bruneton J. *Pharmacognosy, 2. izdaja.* Lavoisier publishing, Pariz, 1999: 310-325, 464-471, 661-665.
21. Umek A. *Disertacija - Kemijske raziskave navadnega kločka – Staphylea pinnata L.* Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo, VTOZD Farmacija, Ljubljana, 1986: 50-75.
22. Yang B, Karlsson RM, Oksman PH, Kallio HP. *Phytosterols in Sea Buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) Berries: Identification and Effects of Different Origins and Harvesting Times.* J Agric Food Chem 2001; 49: 5620-5629.
23. Nes WR. *A Comparison of Methods for the Identification of Sterols.* Meth Enzym 1985; 111: 3-37.
24. Furlong ST, Samia JA, Rose RM, Fishman JA. *Phytosterols Are Present in Pneumocystis carinii.* Antim Ag Chemoth 1994; 38: 2534-2540.
25. López-Hernández J, González-Castro MJ, Piñeiro-Sotelo M. *Determination of Sterols in Sea Urchin Gonads by High-Performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection.* J Chrom Sci 1999; 37: 237-239.

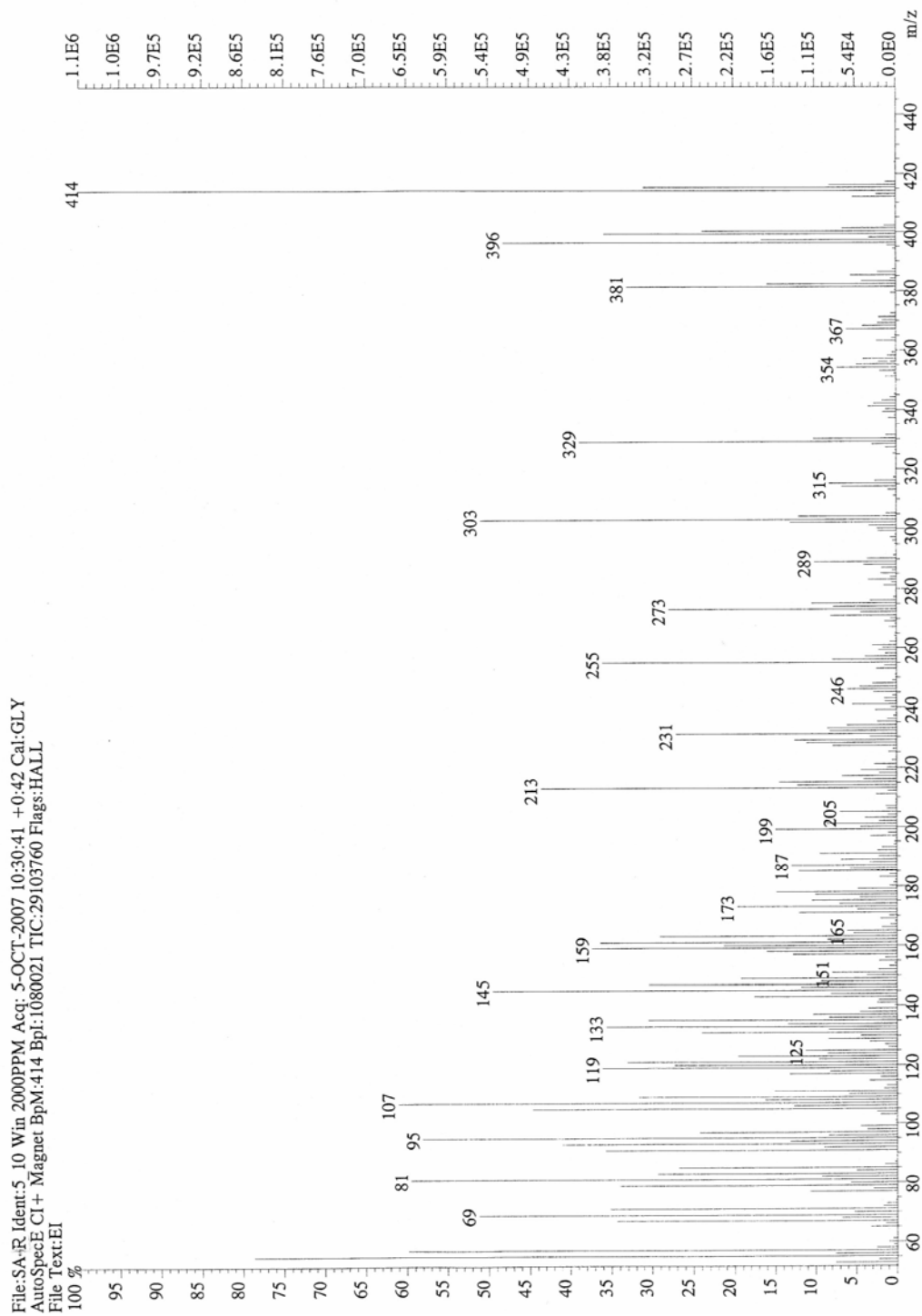
26. El Hattab N, Daghbouche Y, El Hattab M, Pioveti L, Garrigues S, De la Guardia M. *FTIR-determination of sterols from the red alga Asparagopsis armata: Comparative studies with HPLC*. Talanta 2006; 68: 1230-1235.
27. Falnes HM, Milne GWA, Winkler HU, Beckey HD, Damico JN, Barron R. *Comparison of Mass Spectra of Some Biologically Important Compounds as Obtained by Various Ionization Techniques*. Anal Chem 1975; 47: 207-219.
28. Kalo P, Kuuranne T. *Analysis of free and esterified sterols in fats and oils by flash chromatography, gas chromatography and electrospray tandem mass spectrometry*. J Chrom A 2001; 935: 237-248.
29. Dorfman L. *Ultraviolet Absorption of Steroids*. Chem Rev 1953; 53: 47-144.
30. Wagner A, Blatt S, Zgainski EM. *Drogenanalyse*. Springer-Verlag, Berlin, 1983: 163-165, 302-304.
31. Afaq-Husain S. *Taxonomic and Phytochemical Investigations on Rhodophyta from the Coast of Karachi with Special Reference to Nematodes*. Department of Botany, University of Karachi, Pakistan, 1992: 108.
32. Zhang X, Cambrai A, Miesch M, Roussi S, Raul F, Aoude-Werner D, Marchioni E. *Separation of Δ^5 - and Δ^7 -Phytosterols by Adsorption Chromatography and Separative Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography for Quantitative Analysis of Phytosterols in Food*. J Agric Food Chem 2006; 54: 1196-1202.
33. Thorne Research, Inc. *Astragalus membranaceus*. Alter Med Rev 2003; 8: 72-77.
34. Cunha SS, Fernandes JO, Oliveira MBPP. *Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. J Chrom A 2006; 1128: 220-227.
35. Yamaya A, Endo Y, Fujimoto K, Kitamura K. *Effects of genetic variability and planting location on the phytosterol content and composition in soybean seeds*. Food Chem 2007; 102: 1071-1075.

8 PRILOGE

8.1 Priloga 1: MS spekter SA-H.



8.2 Priloga 2: MS spekter SA-R.



8.3 Priloga 3: Referenčni MS spekter β -sitosterola.

Rank: 4 NISTREP #12114 Purity: 584 Mixture: 939 Matched: 8 MF: C29H50O MW: 414 CAS: 83-46-5 NIST: 23648 >
Name: .beta.-sitosterol SMILES: CCC(C)C(C)C2CC=C1CC(O)CCCC(C)C(C)C

