

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA TAVČAR

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA TAVČAR

**IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA STEROLOV IZ
VRSTE *EUPHORBIA ACANTHOTHAMNOS***

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF STEROLS FROM
SPECIES *EUPHORBIA ACANTHOTHAMNOS***

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala na katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo Univerze v Regensburgu pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta.

Eva Tavčar

Ljubljana, september 2010

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

VSEBINA

1.	Uvod	1
1.1.	Družina mlečkovk	1
1.2.	Rod mlečkov	1
1.2.1.	Farmakološki učinki mlečkov	2
1.3.	<i>Euphorbia acanthothamnos</i> L.	4
1.4.	Triterpenoidi	6
1.4.1.	Spojine s cikloartanskim skeletom.....	8
2.	Namen dela.....	10
3.	Materiali in metode.....	11
3.1.	Materiali.....	11
3.1.1.	Topila	11
3.1.2.	Devterirana topila in NMR pribor.....	11
3.1.3.	Material za orositvene reagente	11
3.1.4.	Tankoplastna kromatografija	11
3.1.5.	Material za kolonsko kromatografijo	12
3.1.6.	Aparature.....	12
3.1.7.	Rastlinski material.....	13
3.2.	Metode	13
3.2.1.	Priprava orositvenih reagentov	13
3.2.2.	Priprava TLC plošč	14
3.2.3.	Optimizacija mobilne faze	15
3.2.4.	Ločba spojin: pregled in opis	16
4.	Rezultati in razprava.....	20
4.1.	Izolacija spojin.....	20
4.1.1.	Opis ekstraktov	20
4.1.2.	Optimizacija mobilne faze	20
4.1.3.	Izbira orositvenega reagenta	23
4.1.4.	Izolacija.....	25
4.2.	Identifikacija spojin	40
4.2.1.	Struktura SUB1	40
4.2.2.	Struktura SUB2	47
5.	Sklep	51

SEZNAM SLIK

Sliki 1 in 2. <i>Euphorbia acanthothamnos</i>	4
Slika 3. Oleanolna kislina(levo) in β -sitosterol (desno).....	5
Slika 4. Izopren	6
Slika 5. Lanostanski skelet.....	7
Slika 6. Del biosinteze fitosterolov	7
Slika 7. Shema ločbe spojin	16
Slika 8. TLC razvit v DCM/MeOH/H ₂ O (70/30/3), DCM in MeOH ekstrakt, VIS (levo) in UV-366 nm (desno)	21
Slika 9. TLC razvit v EtOAc/MeOH/H ₂ O (5/5/1), DCM in MeOH ekstrakt, VIS (levo) in UV-366 nm(desno)	21
Slika 10. TLC razvit v EtOAc, DCM in MeOH ekstrakt, VIS (levo) in UV-366 nm(desno)	21
Slika 11. TLC razvit v cHex, DCM in MeOH ekstrakt, VIS	21
Slika 12. TLC razvit v DCM/MeOH (9/1), DCM in MeOH ekstrakt, VIS	22
Slika 13. TLC razvit v EtOAc/petroleter (1/1), DCM in MeOH ekstrakt, VIS	22
Slika 14. TLC razvit v cHex/EtOAc (7/3), DCM ekstrakt, VIS	22
Slika 15. TLC razvit v nakisanem EtOAc, DCM in MeOH ekstrakt, VIS (levo) in UV-366 nm (desno)	22
Slika 16. TLC razvit v nakisanem EtOAc/petroleter (1/1), DCM in MeOH ekstrakt, VIS (levo) in UV-366 nm(desno)	22
Slika 17. TLC plošči razviti v različnih mobilnih fazah: DCM ekstrakt (levo) v cHex/EtOAc (9/1), in MeOH ekstrakt (desno) v EtOAc/MeOH (9/1), VIS, 'naturstoff' reagent	23
Slika 18. TLC plošči razviti v različnih mobilnih fazah: DCM ekstrakt (levo) v cHex/EtOAc (9/1), in MeOH ekstrakt (desno) v EtOAc/MeOH (9/1), UV-366 nm, 'naturstoff' reagent	23
Slika 19. TLC plošči razviti v različnih mobilnih fazah: DCM ekstrakt (levo) v cHex/EtOAc (9/1), in MeOH ekstrakt (desno) v EtOAc/MeOH (9/1), VIS, Dragendorffov reagent	23

Slika 20. TLC plošči razviti v različnih mobilnih fazah: DCM ekstrakt (levo) v cHex/EtOAc (9/1), in MeOH ekstrakt (desno) v EtOAc/MeOH (9/1), UV-366 nm, Dragendorffov reagent.....	23
Slika 21. TLC razvit v DCM, DCM ekstrakt, VIS in UV-366 nm, anisaldehid	24
Slika 22. TLC razvit v DCM/MeOH/H ₂ O (70/30/3), MeOH ekstrakt, VIS in UV-366 nm	24
Slika 23. VLC kolona med postopkom izolacije	25
Slika 24. Primer saponinske strukture.....	26
Slika 25. TLC razvit v DCM/cHex (1/1), frakcije 1-5 po VLC1, VIS in UV-366 nm	27
Slika 26. TLC razvit v DCM/MeOH (19/1), združene frakcije 3-12 po VLC1, VIS in UV-366 nm	28
Slika 27. TLCja razvita v DCM/MeOH (198/2), frakcije 15-29 in 41-50 po CC1, UV-366 nm	30
Slika 28. TLC razvit v DCM/MeOH (199/1), združene frakcije po CC1, VIS in UV-366 nm	30
Slika 29. TLC razvit v DCM/MeOH (198/2), frakcije 10-18 po CC2, UV-366 nm.....	31
Slika 30. TLC razvit v DCM/MeOH (198/2), združene frakcije po CC2, VIS in UV-366 nm	32
Slika 31. TLC razvit v DCM/cHex (3/7), frakcije 1-53 po CC3, UV-366 nm	33
Slika 32. TLC razvit v DCM/cHex (7/3), frakciji 8 in 30 po CC3, UV-366 nm	33
Slika 33. TLC razvit v DCM/MeOH (1905/5), SUB3 po CC4, VIS in UV-366 nm.....	34
Slika 34. TLC razvit v DCM/cHex (7/3), SUB1 in SUB2, VIS in UV-366 nm	35
Slika 35. TLC razvit v DCM, frakcije 1-15 po VLC2, VIS in UV-366 nm	36
Slika 36. TLCja razvita v DCM/MeOH (198/2), po CC5, frakcije 1-33, VIS in frakcije 32-51, UV-366 nm	37
Slika 37. Kromatograma po metodi HPLC4, vzorec FR(5-7(32)), detekcija 245-350 nm)	38
Slika 38. TLC razvit v cHex/DCM/MeOH (32/8/1), frakcije 1-33 po S, VIS in UV-366 nm	39
Slika 39. TLC razvit v cHex/DCM/MeOH (7/4/1), združene frakcije po S, VIS	39
Slika 40. ¹³ C spekter spojine SUB1 v CDCl ₃ posnet na aparatu AVA 600	40
Slika 41. ¹ H spekter spojine SUB1 v CDCl ₃ posnet na aparatu AVA 600	41
Slika 42. HSQC spekter spojine SUB1 v CDCl ₃ posnet na aparatu AVA 600.....	41
Slika 43. COSY spekter spojine SUB1 v CDCl ₃ posnet na aparatu AVA 600.....	42
Slika 44. HMBC spekter spojine SUB1 v CDCl ₃ posnet na aparatu AVA 600.....	42

Slika 45. Struktura spojine SUB1, 24-metilencikloartanol	43
Slika 46. ^{13}C spekter spojine SUB1 v CDCl_3 posnet na aparatu AVA 600, neznan vrh	45
Slika 47. HSQC spekter spojine SUB1 v CDCl_3 posnet na aparatu AVA 600, neznan vrh.....	45
Slika 48. Cikloleukalenol: 4,14-dimetil-9,19-cikloergost-24(28)-en-3-ol ($3\beta,4\alpha,5\alpha$)	46
Slika 49. Ciklolanostan: 9,19-ciklolanost-24-en-3-ol (3β)	46
Slika 50. 4,14-dimetil-5-ergosta-8,24-dien-3-ol	46
Slika 51. ^{13}C spekter spojine SUB2 v CDCl_3 posnet na aparatu AVA 600	47
Slika 52. ^1H spekter spojine SUB2 v CDCl_3 posnet na aparatu AVA 600	48
Slika 53. HSQC spekter spojine SUB2 v CDCl_3 posnet na aparatu AVA 600.....	48
Slika 54. Struktura spojine SUB2, 24-metilencikloartanolacetat	49
Slika 55. 4,14-dimetil-5-ergosta-8,24-dien-3-acetat	50
Slika 56. Cikloleukalenol acetat: 4,14-dimetil-9,19-cikloergost-24(28)-en-3-acetat ($3\beta,4\alpha,5\alpha$)	50
Slika 57. Ciklolanostan acetat: 9,19-ciklolanost-24-en-3-acetat (3β).....	50

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I. Nove spojine, izolirane iz različnih vrst mlečkov.....	2
Preglednica II. Sistematika vrste <i>Euphorbia acanthothamnos</i>	4
Preglednica III. Spojine, izolirane iz vrste <i>Euphorbia acanthothamnos</i>	5
Preglednica IV. Preizkušene mobilne faze za diklorometanski ekstrakt	15
Preglednica V. Preizkušene mobilne faze za metanolni ekstrakt.....	15
Preglednica VI. Mase frakcij, dobljenih iz DCM ekstrakta po metodi VLC1	29
Preglednica VII. Retencijski faktorji SUB1, SUB2 in SUB3.....	34
Preglednica VIII. Mase frakcij, dobljenih iz DCM ekstrakta po metodi VLC2.....	36
Preglednica IX. ^{13}C (150.92 MHz) in ^1H (600.13 MHz) 20 mg spojine SUB1 v CDCl_3 ..	44
Preglednica X. ^{13}C (150.92 MHz) in ^1H (600.13 MHz) 7 mg spojine SUB2 v CDCl_3	49

POVZETEK

Raziskovanja rastlin rodu *Euphorbia* so pokazala širok kemijski spekter vsebovanih spojin. Med njimi najdemo mnogo toksičnih, nemalo pa je takih z že znanimi ali obetajočimi terapevtskimi indikacijami. Dosedanje raziskave grške endemske vrste *Euphorbia acanthothamnos* L. so privedle do določitve desetih spojin z antioksidativnim, protivnetnim, antihiperlipidemičnim, leičmanocidnim, protitumornim in protivirusnim delovanjem. Osnovni namen diplomske naloge je bila izolacija in identifikacija novih spojin iz omenjene vrste.

Pri izolaciji smo se posluževali različnih metod normalnofazne adsorpcijske kromatografije: tankoplastne, kolonske in tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Poslužili smo se tudi gelske filtracije s Sephadexom LH-20[®]. Metode so se izkazale kot uspešne za začetne stopnje izolacije. Z njimi smo dobili dve zmesi med sabo zelo podobnih spojin. V vsaki zmesi je prevladovala po ena, katere strukturo smo uspeli identificirati s pomočjo jedrske magnetne resonance in masne spektrometrije.

Določili smo strukturi prekurzorja fitosterolov 24-metilencikloartanola ter njegovega derivata 24-metilencikloartanol acetata. 24-Metilencikloartanol zmanjšuje plazemske koncentracije holesterola in tako sodeluje pri preprečevanju nastanka ateroskleroze. Dolgoročno učinkuje proti hiperglikemiji ter dokazano znižuje nivo hemoglobina A1c brez nastanka akutne hipoglikemije.

Z rezultati našega raziskovalnega dela smo uspešno prispevali k že znanemu spektru spojin v vrsti *Euphorbia acanthothamnos* L.

ABSTRACT

According to studies of the plant genus *Euphorbia*, there is a wide variety of chemical substances present in its species. Many are toxic, but also those with known or prospective therapeutic indications can be found among them. The research of the Greek endemic species *Euphorbia acanthothamnos* L. has led to determination of ten substances with antioxidant, anti-inflammatory, antihyperlipidemic, antileishmania, antitumor and antiviral effects. The main objective of our work was to isolate new compounds from *Euphorbia acanthothamnos* and to elucidate their structures.

For isolation, normal-phase adsorptive chromatography as thin-layer, column and HPLC chromatography methods have been used, as well as gel chromatography with material Sephadex LH-20®. The methods have proven to be capable of isolating two fractions, each containing mixtures of similar substances. We were able to elucidate one predominate substance in each mixture with use of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectra.

We identified two structures of phytosteroles precursors 24-methylenecycloartanole and its derivative, 24-methylenecycloartanole acetate. In previous studies, 24-methylenecycloartanole has shown to lower plasma concentrations of cholesterol and therefore preventing the development of atherosclerosis. In long term usage it is proven to act against hyperglycemia by lowering levels of hemoglobin A1c and without causing acute hypoglycemia.

With our work, we have successfully contributed to the known spectrum of substances in plant *Euphorbia acanthothamnos* L.

SEZNAM OKRAJŠAV

CC	Column Cromatography (kolonska kromatografija)
cHex	Cikloheksan
COSY	Correlation Spectroscopy
DCM	Diklorometan
EtOAc	Etilacetat
FR	Frakcija
HPLC	tekočinska kromatografija visok ločljivosti (High-performance liquid
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IPP	Izopentidilpirofosfat
MeOH	Metanol
MS	mass spectrometry (masna spektrometrija)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
n-BuOH	n-butanol, 1-butanol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (jedrska magnetna resonanca)
P	Tlak
R _f	retencijski faktor
ROESY	Rotating Frame Overhouse Effect Spectroscopy
SUB1	Substanca 1
SUB2	Substanca 2
SUB3	Substanca 3
T	Temperatura
TLC	Thin Layer Chromatography (tankoplastna kromatografija)
UV-254 nm	ultravijolična svetloba pri 254 nanometrih
UV-366 nm	ultravijolična svetloba pri 366 nanometrih
VIS	vidna svetloba
VLC	Vacuum Liquid Chromatography (vakumska tekočinska kromatografija)

1. UVOD

1.1. Družina mlečkovk

Družina mlečkovk (*Euphorbiaceae*) obsega okrog 7500 vrst enoletnic, zelnatih trajnic, polgrmov, grmov in dreves združenih v okoli 300 rodov. Številne rastline te družine so ekonomsko pomembne. Med njimi so tapioka (*Manihot esculenta*), ki se uporablja v prehrambni industriji, ricinus kot vir ricinovega olja (*Ricinus communis*), jatrofa za pridobivanje biogoriva (*Jatropha curcas*), in kavčukovec (*Hevea brasiliensis*) za proizvajanje gume. Mnoge vrste gojijo kot okrasne rastline. Najznačilnejša med njimi je božična zvezda (*E. pulcherrima*). Tkiva mlečkovk so bogata z belim mlečnim sokom, po katerem je družina dobila slovensko ime. Posledica raznolikosti mlečkov je tudi kemijska raznolikost substanc, ki se nahajajo v njih. V določenih mlečkih najdemo mnogo polifenolov, čreslovin in alkaloidov, v drugih pa eteričnih olj in saponinov. Za strupenost mlečka so zaslužni predvsem diterpenski estri, cianogeni glikozidi in lektini. Značilen je za poddružino *Euphorbioideae* (1, 2).

1.2. Rod mlečkov

Rod mlečkov (*Euphorbia* L.) je s približno 2000 vrstami drugi največji rod cvetnic. Značilnost rodu je v pestrosti življenskih okolij njegovih predstavnikov, saj jih najdemo po vsem svetu. Največ mlečkovk uspeva v tropskih in subtropskih predelih Indijsko Malezijskega območja ter Amerike. V sukulenti obliki jih najdemo na sredozemskem območju, bližnjem vzhodu in v južni Afriki (3). Za mlečke je značilna skupna zgradba osnovnega socvetja, imenovanega ciatij, ki ga ne najdemo pri nobenem drugem rodu. Zgrajen je iz pecljatega ženskega cveta brez cvetnega odevala, obdanega s petimi skupinami moških cvetov. Na robu čašastega ovoja, ki obdaja cvetove so nameščene medovne žleze. Nanje so lahko pritrjeni še petaloidni, venčnim listom podobni priveski. Vlogo cvetnega odevala pogosto prevzamejo rumeno ali rdečeobarvani podporni listi, nameščeni pri dnu ciatija. Posamezni ciatiji so združeni v pakobulasta sestavljena socvetja. Za mlečke je značilna protoginija. To pomeni, da se v ciatiju najprej razvije pestič in šele nato prašniki, kar zmanjšuje verjetnost samooprašitve znotraj ciatija. Kljub temu je samooprašitev omogočena zaradi postopnega razvijanja posameznih ciatijev (4). Botanično

ime *Euphorbia* izhaja iz grškega imena Euphorbus, domnevno po grškem zdravniku, ki je eno najbolj strupenih vrst *Euphorbia resinifera* Berg. svetoval kot laksativ. Angleško ime 'spurges' izhaja iz glagola 'to purge' - iztrebiti. (3)

1.2.1. Farmakološki učinki mlečkov

Iz predstavnic rodu *Euphorbia* je bilo izoliranih mnogo do takrat še neznanih spojin s potencialno biološko učinkovitostjo.

Preglednica I. Nove spojine, izolirane iz različnih vrst mlečkov

VRSTA MLEČKA	NOVE SPOJINE
<i>E. helioscopia</i>	2 α -hidroksihelioscopinolid C
<i>E. fischeriana</i>	languin C, fischeria A
<i>E. resinifera</i>	euphorbiozid A in B
<i>E. wangii</i>	euphanginol
<i>E. lathyris</i>	lathiranon A, lathiranojska kislina A
<i>E. salicifolia</i>	salicifolin, euphosalicin (5)
<i>E. serrulata</i>	serrulatin A in B (6)
<i>E. resinifera</i>	resiniferatoksin (7)
<i>E. pubescens</i>	euphopubescenol, euphopubescent (8)
<i>E. terracina</i>	terracinolidi (9)
<i>E. turczaninowii</i>	5 novih jatropanskih diterpenoidov (10)

Med njimi prevladujejo številni fitotoksini, predvsem diterpenski estri, seskviterpeni, steroli, glikozidi, alkaloidi in toksini ricinskega tipa (1). Triterpene uporabljajo kot kemotaksonomske markerje. Terpenski estri v mlečku so zelo jedki in dražeči. Do vnetij pride bodisi ob neposrednem stiku s kožo, bodisi preko hlapov, ki povzročajo vnetja oči in mukoznih membran (3, 6, 11). Ena glavnih učinkovin mlečka je grenak lakton evforbon, ki lokalno na koži povzroča vnetje z mehurji in nekrozami. Lastnost pri Cipresastem mlečku (*E. cyparissias*) izkoriščamo pri odstranjevanju bradavic, aken, šena in luskavici. *E. lateriflora* v Nigeriji uporabljajo za zdravljenje sifilisa in proti naglavnim ušem (12). Sok mnogih mlečkov (*E. tirucalli*) ob peroralni aplikaciji povzroči notranje vnetje sluznic prebavil z bolečinami, drisko in slabostjo (13). V mlečku *E. resinifere* so odkrili resiniferatoxin, analog kapsaicina, ki je desenzitiziral in zmanjšal nevrogeno vnetje

primarnih senzornih nevronov. Desenzitizacija je obetajoč pristop k zdravljenju nevrogene bolečine, ki jo povzročajo na kapsaicin občutljivi nevroni. Antinociceptivno delovanje na podganah so pokazali heksanski, kloroformski in etilacetatni ekstrakti *E. heterophylla* in vodni ekstrakt lateksa *E. royleana*. Slednji deluje tudi protivnetno. Peroralna aplikacija petroletrnega ekstrakta nadzemnih delov *E. splendens* je privedla do zmanjšanja edema in volumna eksudata ter inhibirala migracijo levkocitov v prizadetem tkivu (6). Mlečka *E. cooperi* in *E. ingens* se v Afriki uporablja za lovljenje rib. Travo, prepojeno z mlečkom vržejo v ribnik in počakajo, da ribe same splavajo na površje (3). Lateks nekaterih vrst uporablja Bušmani za zastrupljanje puščic pri lovnu. Iz *R. membranacea* so izolirali diterpen bis-tetrahidrofuran-acetogenin-membrarollin, inhibitor NADH oksidaze, ki ustavi dihalno verigo in ima protitumorno delovanje (14). *E. hirta* spada med manj strupene mlečke. V tradicionalni medicini se uporablja za hitrejše celjenje ran in opeklina, za odstranjevanje bradavic, proti astmi, driski in griži. Deluje antispazmolitično in ekspektorativno. Etanolni ekstrakt je deloval na širok spekter bakterijskih sevov, antihistaminsko, protivnetno in imunosupresivno na številnih živalskih modelih (15). Vodne frakcije iz vrst *E. hirta* in *E. paralias* so delovale moluskicidno in antidiarioično z zmanjšanjem motilitete črevesja. Številne vrste kažejo protivirusno aktivnost (14). Lateks in ekstrakt listov iz *E. leuconeura* sta se izkazala kot induktorja Eppstein-Barr-virusa. Aktivnost posameznih frakcij je korelirala z vsebnostjo ingenolnih estrov. Pubescenol, pubescen D ter helioscopindolid A in B iz *E. helioscopia* so inhibirali rast človeških tumorskih celičnih linij. V nasprotju so diterpensi estri forbolnega in ingenolnega tipa iz *E. cauducifolia* znani kot visokoaktivni tumor promotorji in kokancerogeni na mišji koži. Corea in sod. so izvedli raziskavo razmerja med strukturo in delovanjem diterpenoidov kot modulatorjev pri odpornosti proti več snovem. Iz vrst *E. dendroides*, *E. characias*, *E. peplus*, *E. paralias* in *E. helioscopia* so izolirali več kot 70 različnih diterpenoidnih spojin. Predvsem jatropani in latirani so se izkazali kot učinkoviti inhibitorji P-glikoproteina. To je membranski protein, ki sodeluje pri aktivnem transportu toksičnih substanc iz celic. Njegova inhibicija je koristna za izboljšanje biološke uporabnosti mnogih zdravil, na primer citostatikov. Za najučinkovitejša inhibitorja P-glikoproteinov sta se izkazala euphodendroidin D in pepluanin A. Njuna aktivnost je bila vsaj dvakrat višja od aktivnosti ciklosporina A (16).

1.3. *Euphorbia acanthothamnos* L.

Euphorbia acanthothamnos raste v obliki nizkorastočega olesenelega grmičevja. Spada med tako imenovane blazinaste trajnice, saj s svojo nizko in kompaktno okroglo rastjo spominja na blazino. Najdemo jo na območju v okolici Egejskega morja, od Grčije s Kreto preko Turčije do bližnjega vzhoda. Raste na območjih od 0 do 2000 m nadmorske višine, kjer uspešno kljubuje najzahtevnejšim razmeram (17). Je del t.i. egejske figrane, področja, pokritega z nizkim, trnatim grmičevjem (18, 19). Cveti od marca do junija, predvsem na apnenčastih tleh (17). Je sukulent, kar pomeni, da je sposobna rasti v zelo sušnem okolju. Njeno tkivo kopiči veliko vode. Svetlozeleni skupki listov so pokriti z rumenkastimi kobuli. Veje in plodne glavice so polne trnov, ki grmičevje ščitijo pred kozjimi čredami (20). Prevod imena *Euphorbia acanthothamnos* bi iz latinčine pomenil 'trnast grm'. V angleščini se imenuje 'greek spiny spurge', kar bi po našem prevodu pomenilo 'grški trnasti mleček'.



Slike 1 in 2. *Euphorbia acanthothamnos*

Preglednica II. Sistematika vrste *Euphorbia acanthothamnos* (21)

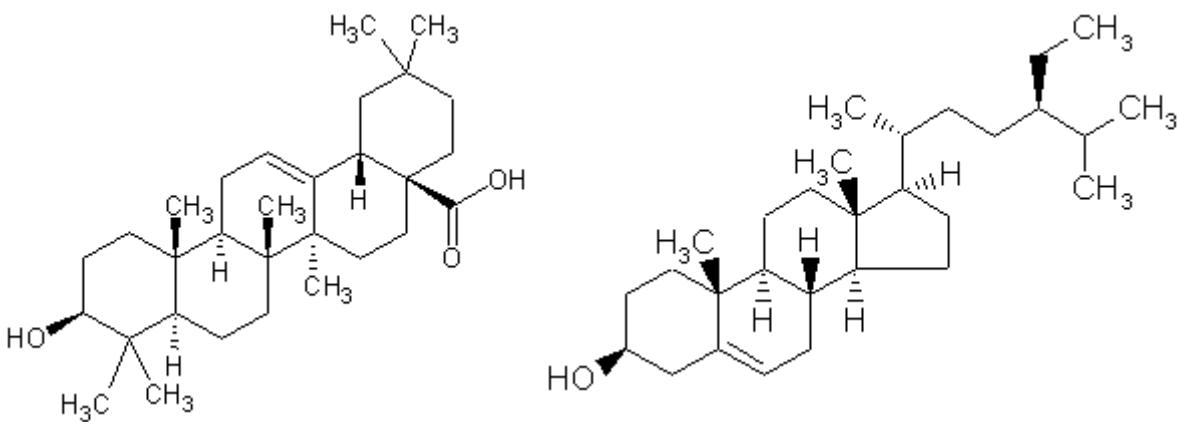
kraljestvo	<i>Plantae</i>	Rastline
deblo	<i>Spermatophyta</i>	Semenke
poddeblo	<i>Magnoliophytina</i>	kritosemenke
razred	<i>Magnoliopsida</i>	dvokaličnice
podrazred	<i>Rosidae</i>	
nadred	<i>Violanae</i>	
red	<i>Euphorbiales</i>	mlečkovci
družina	<i>Euphorbiaceae</i>	mlečkovke
rod	<i>Euphorbia</i>	Mlečki
vrsta	<i>Euphorbia acanthothamnos</i>	

Myrianthopoulos in sod. so izvedli fitokemijsko raziskavo vsebnosti *E. acanthothamnos*. Izolirali so substance, navedene v preglednici III.

Preglednica III. Spojine, izolirane iz vrste *Euphorbia acanthothamnos*

FLAVONOIDI	FLAVONOIDNI GLIKOZIDI	TERPENI
naringenin	kvercetin-3-O- α -L-arabinopyranosid	β -sitosterol
eriodiktiol	kempferol-3-O- α -L-arabinopiranozid	oleanojska kislina
katehin	naringenin-7-O- β -D-glukopiranozid	ent-3-oksoatisan-16 α -17-diol
epikatehin		

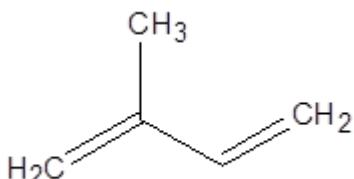
Ent-3-oksoatisan-16 α -17-diol je redek diterpen, značilen le za družino *Euphorbiaceae*. Deloval je proti leišmaniozi (22), ki jo povzroča bičkar rodu *Leishmania* sp. in jo prenašajo dvokrile žuželke. Kvercetin je močan antioksidant s protivnetnim delovanjem. Med antioksidante spadajo še catehin, epicatehin, naringenin in kempferol. Tudi Barla in sod. so v etanolnem ekstraktu *E. acanthothamnos* odkrili visoko vsebnost fenolov z antioksidativnim delovanjem (23). Eriodiktiolu so Rojas in sod. dokazali vazodilatatorno delovanje (24). Oleanolna kislina deluje protivnetno, hepatoprotективno, antitumorno in protivirusno (25, 26, 27). β -sitosterol zmanjša absorpcijo holesterola v prebavnem traktu (28). Oleanolna kislina in β -sitosterol sta fitosterola, predstavnika skupine triterpenoidov.



Slika 3. Oleanolna kislina (levo) in β -sitosterol (desno)

1.4. Triterpenoidi

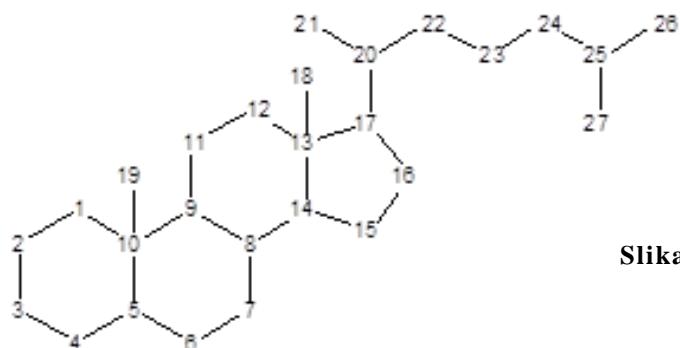
Triterpenoidi obsegajo veliko in raznoliko skupino derivatov izoprena. So terpenu podobni lipidi. Za terpene je značilna molekulska formula $(C_5H_8)_n$. Nastanejo iz linearne povezanih izoprenskih enot, ki nemalokrat ciklizirajo. Pri triterpenoidih ponavadi sledi odstranitev posameznih ogljikovih atomov. Kljub pogosti odstranitvi ogljikov triterpenoide po biogenetskem pravilu klasificiramo glede na število izoprenskih enot, iz katerih so sestavljeni.



Slika 4. Izopren

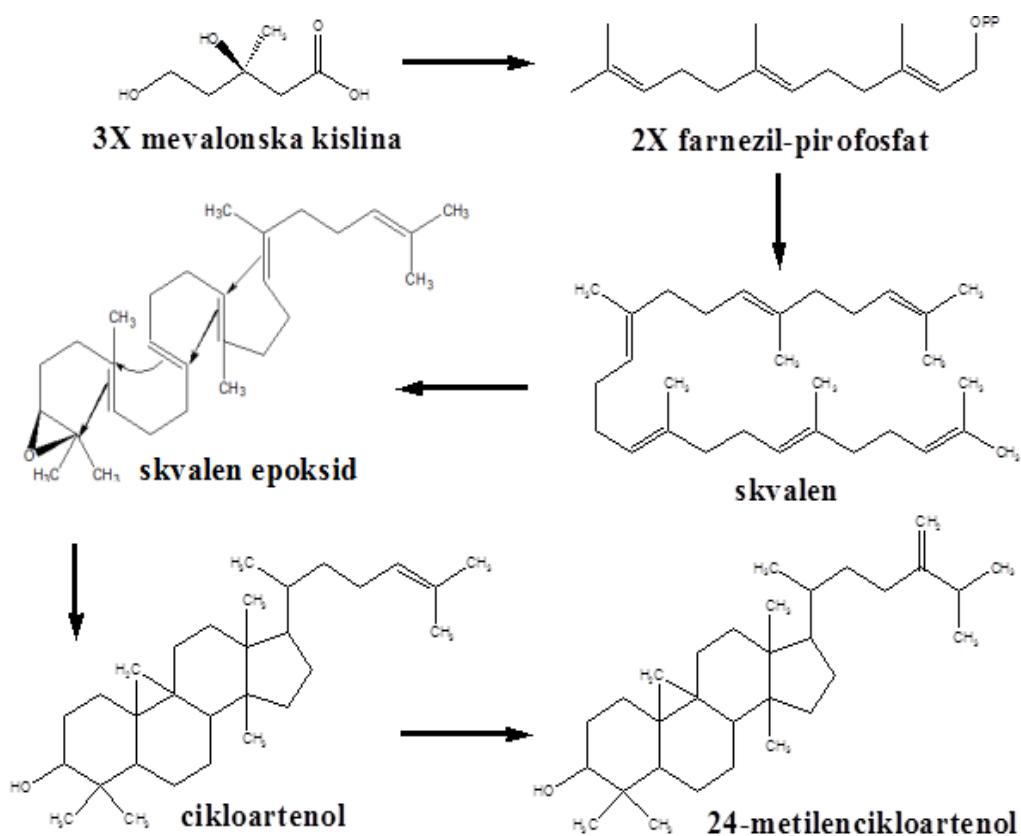
Izopren sicer služi kot osnovna struktura za klasifikacijo triterpenov, a ni pravi prekurzor pri biosintezi. Osnovni prekurzor, skupen vsem triterpenoidom je izopentenilpirofosfat (IPP). Izopentenilpirofosfat v rastlinah nastaja po dveh poteh. V plastidih se tvori iz 1-deoksi-D-ksiluloze-5-fosfata (DOXP), ki nastane s sintezo piruvata in D-glicerinaldehid-3-fosfata, v citoplazmi in mitohondriih pa iz acetil-CoA. Rastline za biosintezo fitosterolov večinoma porabljajo IPP, ki nastane po acetatno-mevalonatni poti. V manjši meri IPP nastaja po DOXP (1-deoksi-ksiluloza 5P) in MOP (2-metil-eritritol 4P) poti.

Fitosteroli so rastlinski triterpenoidi, sestavljeni iz šestih izoprenskih enot. Tri izoprenske enote v obliki IPP-fosfatov tvorijo farnezilpirofosfat. Dva farnezilpirofosfata kondenzirata v skvalen, ki oksidira v skvalen-2,3-oksid. 3β -hidroksitrterpenoidi so ciklični derivati 3S-izomera skvalen-2,3-epoksida. Stereokemijo obroča določa konformacija, ki jo slednji zavzame ob ciklizaciji. Ciklizacija konformacije stol-stol-stol-kad vodi do damaranskega kationa. Damarani se v naravi pogosto pojavljajo v obliki glikozidov. Stereoizomer damaranskega kationa je protostanski kation. Tvori se ob ciklizaciji all-trans-skvalen-2,3-epoksidne konformacije stol-kad-stol-kad. Do različnih tipov damaranskih in protostanskih skeletov nato pride z migracijami 1,2-hidridne in metilne skupine kationskega intermediata. Tako iz protostanskega kationa nastane lanostanski skelet.



Slika 5. Lanostanski skelet

Lanosterol je v kraljestvu živali biogenetski prekurzor steroidov. Struktura lanostana služi za osnovo pri številčenju steroidov in podobnih tetracikličnih triterpenoidov. V rastlinskem svetu lanosterola skoraj ne najdemo, nahaja pa se v nekaterih gobah, na primer *Ganoderma lucidum*, kjer sodeluje pri proliferaciji.



Slika 6. Del biosinteze fitosterolov

1.4.1. Spojine s cikloartanskim skeletom

Steroidom podobne molekule v rastlinskem svetu imenujemo fitosteroli. Zanje je značilen 3-monohidroksiperhidro-1,2-ciklopantanofenantrenski obroč. V fotosintetsko aktivnih organizmih s pomočjo encima cikloartenol sintaze iz skvalen-2,3-oksida nastaja cikloartenol.

Cikloartenol je, podobno kot lanosterol pri živalih, pri rastlinah glavni prekurzor sterolov. Za cikloartane se uporablja kemijsko ime 9,19-ciklolananstan, saj tetraciklične triterpenoide poimenujemo po sorodnih steroidnih obročih. Tvorijo se s preureditvami protostanskega kationa, ki vključujejo ciklizacijo za tvorbo vezi na mestih 9 in 19 (29). Metiliranje stranske verige cikloartenola vodi do nastanka 24-metilencikloartanola. Reakcijo katalizira encim sterol-metiltransferaza (SMT).

Spojine s cikloartanskim skeletom so bile izolirane iz mnogih rastlinskih vrst. Vsebnost fitosterolov je odvisna od vrste rastline, njene starosti in pogojev rasti. Steroli se v rastlinah nahajajo v prosti obliki, v obliki estrov z maščobnimi ali fenolnimi kislinami, glikozidov ter na C-6 aciliranih glikozidov. O uravnavanju biosinteze fitosterolov še ni veliko znanega. Ko jih je v rastlini preveč, se prekurzorja cikloartenol in 24-metilencikloartanol zaestrita z maščobnimi kislinami in skladiščita v maščobne kapljice. Na biosintezo naj bi vplival encim β -hidroksi- β -metilglutaril-CoA-reduktaza (HMGR) (30).

Steroli v rastlinah opravljajo funkcijo gradnikov citoplazemskih, mitohondrijskih in kloroplastnih celičnih membran. Najbolj zastopani predstavniki so sitosterol, sigmasterol in kampesterol, v nekaterih vrstah pa tudi holesterol. Molekule sterolov v prostoru izpostavljajo dve planarni površini, ki omogočata tvorbo raznih hidrofobnih vezi z ostalimi komponentami membran. Sitosterol in 24-metilholesterol podobno kot holesterol pri živalih uravnavata fluidnost in prepustnost membran. S tem rastlini med drugim omogočata prilagajanje temperaturnim razmeram. V rastlinskih celicah steroli uravnavajo aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze, diferenciacijo in proliferacijo celic. So prekurzorji steroidov, ki v rastlinah opravljajo funkcijo rastnih hormonov, ter prekurzorji saponinov in alkaloidov. Vedno pomembnejšo vlogo igrajo v prehranski industriji, kjer jih uporabljamo kot prehranska dopolnila in aditive. Zmanjšujejo namreč absorpcijo holesterola v prebavilih. Največ jih najdemo v rastlinskih oljih in žitih. Njihovo protitumorno delovanje je predmet številnih raziskav (31, 32).

Cikloartenil ferulat in 24-metilencikloartanil ferulat sta glavni učinkovini gama orizanola, zmesi estrov fitosterolov s ferulično kislino. Pridobiva se iz olja riževih otrobov.

Pripisujejo mu antioksidativne, gonadotropne in antiarteriosklerotične učinke. Niža namreč plazemske in serumske koncentracije holesterola, zmanjšuje njegovo absorpcijo v prebavnem traktu in agregacijo trombocitov. Z uravnavanjem izločanja hormonov naj bi blažil težave v klimakteriju ter vplival na povečanje mišične mase (30, 33, 34). Inagaki in sod. so leta 1987 vložili patentno prijavo za kompleks cikloartenolnega ferulata s ciklodekstrinom kot pomožno snovjo za izboljšanje biološke uporabnosti. Sami rastlinski steroli ali njihovi estri namreč zaradi šibke topnosti v polarnih topilih izkazujejo slabo absorpcijo iz prebavnega trakta. Kot učinkovit kompleks s ciklodekstrinom so omenili 24-metilencikloartanol (35).

Highuchi in sod. so leta 2007 pripravili patentno prijavo za zdravilo, hrano ali pijačo, ki izboljšuje stanje hiperglikemije in zapletov, povezanih z njo. Kot glavno učinkovino so predlagali spojino s ciklolanstanskim skeletom, med drugim 24-metilencikloartanol in cikloartenol. Preverili so peroralno delovanje spojine na nivo hemoglobina A1c na mišjih modelih. Obe spojini sta dolgoročno znižali nivo hemoglobina A1c brez nastanka akutne hipoglikemije. Substanci sta se izkazali za varni, brez vpliva na telesno maso in patoloških sprememb. Hemoglobin A1c je produkt vezave hemoglobina z glukozo. V primeru hiperglikemije njegove koncentracije v krvni plazmi narastejo. Iz plazme se izloči šele z odmrtjem eritrocita (120 dni), zato je pokazatelj krvnih koncentracij glukoze skozi daljše časovno obdobje. Je klinično pomemben testni parameter pri ugotavljanju diabetesa melitus. V patentni prijavi so omenili več možnosti pridobivanja spojin. Med njimi je bila ekstrakcija uprašenih listov *Aloe* spp. z mešanico etilacetata in butanola v razmerju 1/3 ali kloroform in metanola v razmerju 2/1. Za čiščenje spojin so predlagali kolonsko kromatografijo z normalnofaznim silikagelom. Kot mobilno fazo so preizkusili gradientno elucijo z mešanico kloroform in metanola, spojina se je izločila pri razmerju 25/1. Za nadaljnje čiščenje so predlagali HPLC, za identifikacijo pa MS in NMR (36).

Cikloartane iz vrste *Justicia ansellina* so izolirali Kpoviessi in sod. S preparativno tankoplastno kromatografijo so ločili etilacetatni ekstrakt na tri frakcije. Uporabljeni mobilni fazni je bila toluen/etilacetat/metanol v razmerju 80/18/2. Vsako frakcijo so analizirali z GC/MS in med 10 substancami identificirali tudi 2-metilencikloartanol in cikloartenol. Test citotoksičnosti je bil negativen (37).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je iz diklorometanskega ali metanolnega ekstrakta vrste *Euphorbia acanthothamnos* izolirati in identificirati sterolne spojine. Na podlagi razvitih tankoplastnih kromatogramov bomo izbrali primeren orositveni reagent za detekcijo sterolov na TLC plošči in primerne mobilne faze za nadaljnjo izolacijo. Optimalne mobilne faze bomo uporabili pri metodah kolonske kromatografije. Uspešnost ločbe bomo kvalitativno ocenili s tankoplastno kromatografijo in kvantitativno na podlagi računanja masnih deležev dobljenih frakcij glede na izhodni material. Po potrebi bomo preizkusili tudi metode tekočinske kromatografije visoke ločljivosti in gelske kromatografije. Za določitev struktur si bomo pomagali z masnim spektrom ter s spektri jedrske magnetne resonance. V primeru uspešne izolacije popolnoma čistih spojin bomo izmerili njihovo tališče, optično sučnost in izvedli toksikološki MTT test. V kolikor bomo imeli na voljo dovolj rastlinskega materiala, bomo metode za izolacijo dobljenih spojin optimirali.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

3.1.1. Topila

- Chex; cikloheksan, p.a. (ACROS Organics, New Jersey, UK)
- Cikloheksan, HPLC stopnje čistosti
- DCM; diklorometan; p.a. (ACROS Organics, New Jersey, UK)
- EtOAc; etilacetat p.a. (ACROS Organics, New Jersey, UK)
- H_2SO_4 ; žveplova (VI) kislina, 95-97% p.a. (MERCK, Darmstadt, DE)
- Kloroform, HPLC stopnje čistosti
- MeOH; metanol, 99.8% p.a. (MERCK, Darmstadt, DE)
- Metanol LiChroSolv, HPLC stopnje čistosti (MERCK, Darmstadt, DE)
- Ocetna kislina (MERCK, Darmstadt, DE)
- 2-propanol (MERCK, Darmstadt, DE)

3.1.2. Devterirana topila in NMR pribor

- Kloroform-d₁, 99,8% (Deutero GMBH)
- Norell 507-HP (NMR sonda)

3.1.3. Material za orositvene reagente

- Anisaldehid/2-(4-metoksifenil)propan-1,2-diol, zur Synthese (MERCK, Darmstadt, DE)
- Bazični bizmutov nitrat p.a (MERCK, Darmstadt, DE)
- Difenilborna kislina-2-aminoetileter, p.a. purum, 97 % (Fluka)
- Kalijev jodid (MERCK, Darmstadt, DE)
- Polietilenglikol (PEG) 400 (MERCK, Darmstadt, DE)

3.1.4. Tankoplastna kromatografija

- TLC aluminium sheets 20x20 cm; silica gel 60 F₂₅₄ (MERCK, Darmstadt, DE)
- Kadička: Camag 10x10

- Kapilare za nanos raztopin na ploščo: l = 100 mm, d = 1,4-1,5 mm
- UV svetilka z valovno dolžino λ_1 = 254 nm in λ_2 = 366 nm

3.1.5. Material za kolonsko kromatografijo

- VLC in CC: Silica gel 60 za kolonsko kromatografijo; velikost delcev 0,063-0,2 mm (MERCK, Darmstadt, DE)
- Sephadex: Sephadex LH-20 ® (Sigma Aldrich)
- Okrogla vata
- Pesek/seesand (MERCK, Darmstadt, DE)

3.1.6. Aparature

3.1.6.1 Kolonska kromatografija

- Manjša VLC kolona: l = 20 cm, d = 3 cm
- Večja VLC kolona: l = 30 cm, d = 4,5 cm
- CC kolona: Ø3 cm, l ≈ 40 cm
- Sephadex kolona: Ø3,5 cm, l ≈ 55 cm
- Črpalka: Pharmazia LKB

3.1.6.2 HPLC (semipreparativen)

- Oprema ProStar, VARIAN 201, črpalki A: Modell 210, ser. št.05250; B: Modell 210, ser. št. 05251. Detektor: UV-Diode-Array-Detector (DAD)
- Predkolona: Microsorb 100 Si 5 µm; 50x10 mm
- Kolona: Microsorb 100 Si 5 µm; 250x10 mm

3.1.6.3 Rotavapiranje

- Rotavapor Heidolph, Laborota 4003

3.1.6.4 Tehnice:

- Analizna: Sartorius research R160P, Albert Hagl Wägetechnik, Deggendorf
- Elektronska: Sartorius MC1, 6200S, Albert Hagl Wägetechnik, Deggendorf

3.1.6.5 NMR spektroskopija

- ^1H in ^{13}C spektri so bili posneti z Bruker Biospin GmbH Avance 300 spektrometrom na Fakulteti za farmacijo Univerze v Regensburgu. Spektri so bili posneti pri 300 MHz. Kot topilo smo uporabili CDCl_3 .
- ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY in ROESY spektri so bili posneti z NMR Bruker Biospin GmbH Avance 600 spektrometrom na Fakulteti za farmacijo Univerze v Regensburgu. Spektri so bili posneti pri 600 MHz. Kot topilo smo uporabili CDCl_3 .

3.1.6.6 MS - Masna spektrometrija

Thermoquest Finnigan TSQ 7000

3.1.6.7 Programa za procesiranje NMR spektrov

- TopSpin 1.2, Bruker
- SpinWorks 3.1.7.0, Kirk Marat, University of Manitoba

3.1.6.8 Risanje spojin

Za risanje spojin smo uporabili program Chem Draw Net 7.0 podjetja CambridgeSoft Corporation, USA.

3.1.7. Rastlinski material

3,65 g diklorometanskega ekstrakta in 7,32 g metanolnega ekstrakta cele rastline *Euphorbia acanthothamnos* L. Rastlina je bila nabранa v Grčiji v času cvetenja. Ostalih podatkov o rastišču, času nabiranja, sušenju rastline in pripravi ekstraktov nismo imeli na voljo.

3.2. Metode

3.2.1. Priprava orositvenih reagentov

3.2.1.1 Anisaldehid (2-(4-metoksifenil)propan-1,2-diol)

V ledeni kopeli na magnetnem mešalu smo z merilnim valjem odmerili 85 ml metanola, ki smo mu počasi in v naslednjem zaporedju dodali 8 ml ocetne kisline, 5 ml žveplene kisline in 1 ml anisaldehida. Pustili smo mešati 15 min. Reagent smo hranili v hladilniku pri 5°C,

dokler je ohranjal brezbarvnost. S fenom posušen kromatogram smo takoj orosili z orositvenim reagentom. Segrevali smo ga na grelni plošči pri 110°C po 10 min. Vrednotenje kromatograma smo izvajali pri vidni svetlobi in pod UV-366 nm.

3.2.1.2 'Naturstoff' reagent

Raztopina A: 1% aminoethylnega estra difenilborne kisline v metanolu. Raztopina B: 5% polietilenglikola v etanolu. Obe raztopini smo hranili v hladilniku. S fenom posušen kromatogram smo orosili z raztopino A in ga 1 min segrevali na grelni plošči na 80°C. Nato smo ga orosili še z raztopino B. Vrednotili smo pod UV svetilko (366 nm).

3.2.1.3 Dragendorffov reagent (kalijev jodobizmutat)

40 ml vode in 10 ml ocetne kisline smo dodali 0.85 g bazičnega bizmutovega nitrata (raztopina A). V 30 ml vode smo raztopili 8 g kalijevega jodida (raztopina B). Dragendorffov reagent smo dobili z mešanjem enakih volumnov raztopin A in B. Hranili smo ga v hladilniku, zaščitenega pred svetlobo. Posušeni kromatogram smo orosili in ga pustili na sobni temperaturi. Vrednotenje je potekalo pri vidni svetlobi.

3.2.2. Priprava TLC plošč

TLC plošče smo narezali na manjše dele poljubnih velikosti. Na TLC ploščo smo 1 cm od spodnjega roba s svinčnikom narisali črto, ki je označevala mesto nanosa vzorca. Vzorce smo na črto nanašali z mikrokapilaro, predhodno sprano z metanolom. Nanašali smo v obliki črte dolžine 1 cm ali v točke. Pred vsakim novim nanosom smo prvi nanos posušili s fenom. Tako smo odstranili topilo, ki bi v nasprotnem primeru vplivalo na potovanje spojin po stacionarni fazi pri razvijanju kromatograma. Z UV svetilko smo preverjali, če smo nanesli dovolj vzorca za kasnejšo detekcijo. V kadičko smo nalili po 20 ml mobilne faze, da je bilo dno prekrito s približno 5 mm raztopine. Ob steno kadičke smo namestili filtrni papir, ki je segal v mobilno fazo. Tako pripravljeno pokrito kadičko smo pustili stati približno 20 min, da se je notranjost nasitila s hlapi mobilne faze. TLC ploščo smo previdno postavili v kadičko tako, da gladina mobilne faze takoj na začetku ni segala do mesta z nenesenim vzorcem. V pokriti kadički smo ploščo pustili razvijati toliko časa, da je fronta prišla do 90 % dolžine plošče. Razvijanja so potekala v laboratoriju pri temperaturi 22°C. S pinceto smo jo vzeli iz kadičke. S svinčnikom smo označili datum razvijanja, sestavo mobilne faze ter fronto, do katere je mobilna faza priprovala. S fenom smo ploščo

sušili toliko časa, da je mobilna faza vidno izhlapela. Razvito in suho TLC ploščo smo opazovali pod UV svetlobo pri 254 in 366 nm ter s svinčnikom označili vidne lise. Nato smo jih v digestoriju orosili z raztopino anisaldehida ter približno 10 min segrevali na sušilniku, segretem na temperaturo 105°C. TLC ploščo smo slikali s sistemom za dokumentacijo plošč.

3.2.3. Optimizacija mobilne faze

Preglednica IV. Preizkušene mobilne faze za diklorometanski ekstrakt

TOPILA	RAZMERJE
DCM	
DCM/MeOH	9/1
DCM/MeOH	7/3
DCM/MeOH/H₂O	90/10/1 in 70/30/3
DCM/EtOAc	1/1
EtOAc*	EtOAc
cHex	
cHex/EtOAc	7/3 in 3/7
cHex/EtOAc/kislina*	7/3 in 3/7
EtOAc/MeOH	1/1
EtOAc/MeOH*	1/1
MeOH	

*V raztopino smo dodali kapljico klorovodikove kisline (HCl)

Preglednica V. Preizkušene mobilne faze za metanolni ekstrakt

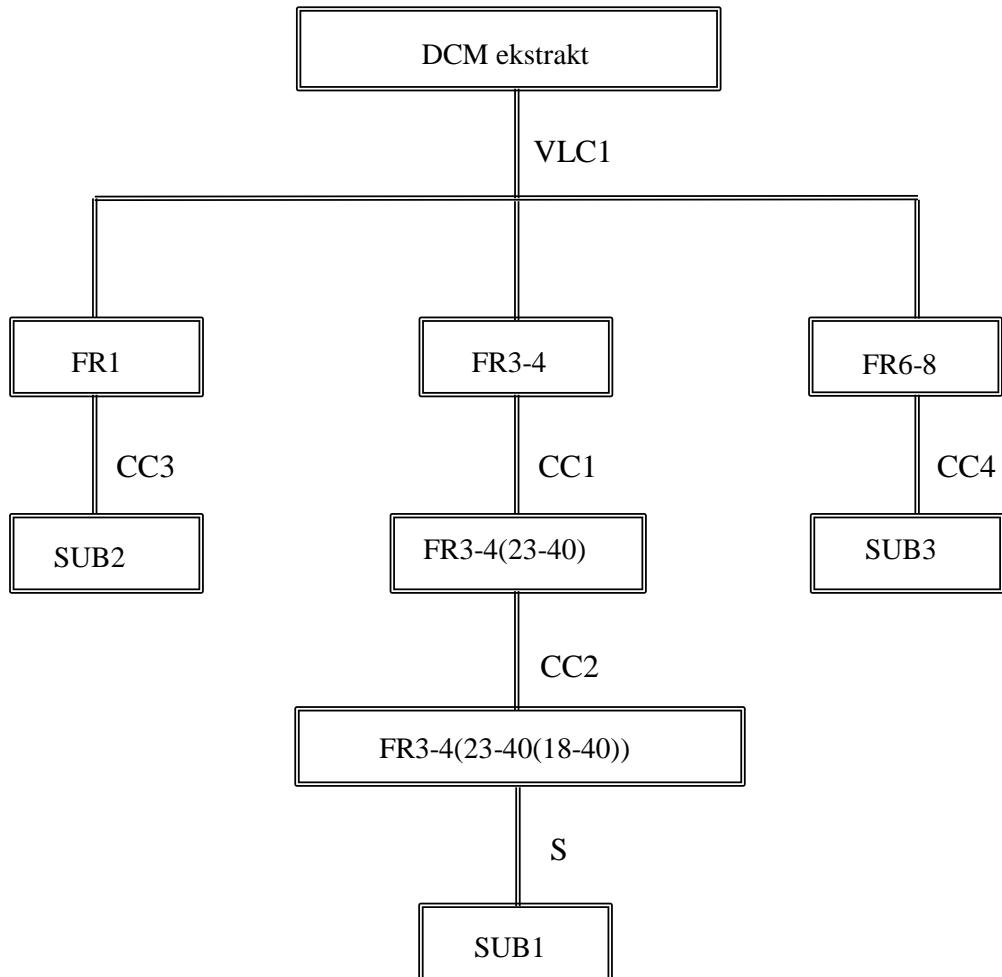
TOPILA	RAZMERJE
MeOH	
EtOAc/MeOH	1:1
EtOAc/MeOH*	1:1
EtOAc/MeOH*	9:1
EtOAc/MeOH	7:3 in 3:7
EtOAc	
EtOAc*	
DCM/EtOAc	1:1
cHex	
cHex/EtOAc*	9:1

*V raztopino smo dodali kapljico klorovodikove kisline (HCl)

3.2.4. Ločba spojin: pregled in opis

- VLC: ločevanje po metodi vakuumsko tekočinske kromatografije, glej 3.2.4.1.
- CC: ločevanje po metodah kolonske kromatografije, glej 3.2.4.2.
- FR: imena frakcij
- SUB: imena izoliranih spojin
- S: ločevanje po metodi s Sephadexom LH-20, glej 3.2.4.4.

Kratek pregled: Na voljo smo imeli 3,65 g diklorometanskega ekstrakta in 7,32 g metanolnega ekstrakta. Prvo ločbo diklorometanskega ekstrakta (1 g), smo izvedli po metodi VLC1. Dobili smo 12 frakcij. Frakcije s podobno sestavo smo združili in nadaljevali s FR1, FR3-4 in FR6-8. Iz FR1 smo po metodi CC3 dobili SUB2. Iz FR3-4 smo z metodo CC1 dobili FR3-4(23-40), s katero smo ločbo nadaljevali po metodi CC2. Dobili smo FR3-4(23-40(18-40)) in njen ločbo nadaljevali po metodi S. Iz FR6-8 smo po metodi CC4 dobili SUB3. Natančnejši opis metod je opisan v poglavjih 3.2.4.1. do 3.2.4.4.



Slika 7. Shema ločbe spojin

Drugo ločbo diklorometanskega ekstrakta (2,65 g) smo izvedli po metodi VLC2. Pridobili smo FR'5-7 (mg), v kateri se je nahajala SUB1. Ločba FR'5-7 je potekala po metodi CC5. Dobljenih 40 frakcij smo kot vzorce uporabili v metodah HPLC.

Po vsaki ločbi smo frakcije prenesli v posodice, ki smo jim predhodno določili težo. Če je bil volumen frakcije prevelik za posodico, smo del topila odparili z rotavaporjem. Topilo v posodici smo odparili do suhega z razpihovalnikom zraka – suhost smo preverili z večkratnim tehtanjem v naslednjih nekaj urah. Z razliko v teži prazne in polne posodice smo določili maso vzorca.

3.2.4.1 Metodi VLC - volume liquid chromatography

V čašo smo zatehtali silikagel za kolonsko kromatografijo in ga prenesli v kolono. Kolono smo dvakrat sprali z diklorometanom, vsakič s pomočjo vodne črpalke. S tem smo dosegli ustrezeno posedanje silikagela in tako zagotovili enakomeren pretok topila skozi stacionarno fazo. Vzorcu smo dodali najmanjšo potrebno količino diklorometana, da se je raztopil v celoti. V to raztopino smo suspendirali še enkrat tolikšno količino silikagela. Suspenzijo smo prelili v bučko z nameščenim filtrom in jo namestili na rotavapor. Ob zunanjem tlaku in temperaturi 38°C je topilo enakomerno izhlapevalo in vzorec se je počasi adsorbiral na silikagel. Na ravno površino silikagela v koloni smo previdno stresli silikagel s predabsorbiranim vzorcem. Na vrh smo dodali še 2 cm peska, ki je preprečil dvigovanje silikagela s predabsorbiranim vzorcem ob dolivanju mobilne faze. Na spodnji del kolone smo s pomočjo premičnega stojala pritrudili bučko. Kolono smo priključili na zračno črpalko in na vrh nanesli 100 ml diklorometana. Vakuum je omogočil, da je mobilna faza hitro in enakomerno potovala skozi stacionarno. Ko se je kolona osušila, smo najprej odstranili cevko z vakuumom, nato šele bučko. Postopek smo ponovili dvanajstkrat. Na koncu smo kolono sprali s 750 ml metanola.

VLC1: stacionarna faza 35 g silikagela, mobilna faza diklorometan, na koncu metanol, vzorec 1g diklorometanskega ekstrakta adsorbiranega na 2 g silikagela, enkraten nanos po 50 ml mobilne faze, 12 zbranih frakcij. S frakcijo FR1 smo nadaljevali po metodi CC3, FR3-4 po metodi CC1 in FR6-8 po metodi CC4.

VLC2: stacionarna faza 40 g silikagela, mobilna faza diklorometan, na koncu metanol, vzorec 2,65 g diklorometanskega ekstrakta adsorbiranega na 6 g silikagela, enkraten nanos po 100 ml mobilne faze, 13 zbranih frakcij. S FR'(5-7) smo nadaljevali ločbo po metodi CC5.

3.2.4.2 Metodi CC: Kolonska kromatografija

Na dno kolone smo položili okrogel kos vate tako, da je v celoti enakomerno prekrivala njen dno. Kolono smo s prižemami pričvrstili na stojalo v digestoriju. Omočili smo jo z nekaj mobilne faze. Količina silikagela naj bi ustrezala 200-250-kratni količini vzorca. Zaradi majhne količine vzorca in večjega premora kolone smo silikagela uporabili še enkrat toliko. Silikagel smo zatehtali in ga suspendirali v enkrat večjem volumnu mobilne faze. Suspenzijo smo v eni potezi prenesli v spodaj zaprto kolono. Počakali smo približno 1 uro, da se je silikagel posedel v topilu in v ta namen kolono občasno rahlo stresali. Vzorcu smo dodali toliko mobilne faze, da smo dobili stabilno raztopino. Za hitrejše raztapljanje smo si pomagali z ultrazvočno kadičko. Kolono smo sprali s 50 ml mobilne faze. Tik preden se je začel zgornji del silikagela sušiti, smo s kapalko začeli previdno ob steni in enakomerno po vsej površini stacionarne faze dodajati raztopljen vzorec. Počakali smo, da se je raven vzorčne raztopine poravnala s stacionarno fazo in nato začeli dodajati mobilno fazo. Mobilno fazo smo napolnili do vrha kolone ter jo ohranjali na enakomernem nivoju zaradi stabilnosti pogojev. Za elucijo smo porabili okrog 400 ml mobilne faze. Frakcije smo lovili v oštevilčene epruvete. Na koncu smo silikagel sprali z metanolom.

CC1: 40 g silikagela, 89,84 mg vzorca FR3-4, mobilna faza DCM/MeOH v razmerju 199/1, 50 zbranih frakcij po približno 2 ml, ki smo jih združili v FR3-4(16-17), FR3-4(18-22), FR3-4(23-40), FR3-4(41-50). S frakcijo FR3-4(23-40) smo nadaljevali po metodi CC2.

CC2: 45 g silikagela, 65,73 mg vzorca FR3-4(23-40), mobilna faza DCM/MeOH v razmerju 198/2, 40 zbranih frakcij po približno 2 ml, ki smo jih združili v frakcije: FR3-4(23-40(1-7)), FR3-4(23-40(8-12)), FR3-4(23-40(13-17)), FR3-4(23-40(18-40)). Spojino SUB1 je vsebovala zadnja frakcija, nadaljevali smo z identifikacijo in metodo S.

CC3: 35 g silikagela, 64,68 mg vzorca FR1, mobilna faza DCM/cHex v razmerju 3/7, zbranih 53 frakcij po približno 2 ml. Spojina SUB2 se je nahajala v FR1(20-53).

CC4: 30 g silikagela, 24,76 mg vzorca FR6-8, mobilna faza DCM/MeOH v razmerju 1905/5, 16 zbranih frakcij po približno 2 ml. Zadnje frakcije smo združili in prevladujočo spojino poimenovali SUB3.

CC5: 50 g silikagela, 256,03 mg vzorca FR'5-7, mobilna faza DCM/MeOH v razmerju 198/2, 40 zbranih frakcij po približno 2 ml. Frakcije smo oštevilčili in uporabili kot vzorce v HPLC metodah.

3.2.4.3 Metode HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Pri HPLC kromatografiji je bil volumen injiciranja čim manjši, raztapljali smo v največ 0,5 ml mobilne faze po približno 1 mg vzorca. Frakcij, ki smo jih dobili po metodi CC5 nismo združili in prenašali iz epruvet v druge vsebnike, da ne bi prišlo do izgub. Topilo od prejšnje metode smo odparili z usmerjenim šibkim tokom zraka neposredno iz epruvet. Nato smo njihove vsebine raztopili v mobilni fazi, jih filtrirali s filtrom za enkratno uporabo ter jih injicirali v HPLC kolono. Kot topila za mobilno fazo smo uporabili kloroform, cikloheksan in metanol, vsa HPLC stopnje čistosti. Pred uporabo smo jih 10 min degazirali v ultrazvočni kadički. Preizkusili smo več metod. Spodaj so navedeni volumski deleži posameznih topil in čas v minutah, v katerem je bilo doseženo novo volumsko razmerje topil v mobilni fazi oziroma čas izokratske elucije. Po vsakem poskusu smo kolono sprali s kloroformom, konec dneva pa z 2-propanolom in pred naslednjim poskusom ekvilibrirali na nove pogoje. Detektirali smo pri 245 do 350 nm.

- HPLC1: kloroform (100 %), 4,7 ml/min
- HPLC2: kloroform (100 %) (20') → kloroform/MeOH (99/1), 4,7 ml/min
- HPLC3: kloroform/cHex (8/2) (28') → kloroform (100 %), 4,7 ml/min
- HPLC4: kloroform/cHex (9/1), 4,7 ml/min
- HPLC5: cHex/kloroform (8/2), 5,5 ml/min)
- HPLC6: kloroform/cHex (1/1) (15'-40') → kloroform (100 %), 4,0 ml/min
- HPLC7: kloroform/cHex (8/2), 4,7 ml/min

3.2.4.4 Metoda S: Sephadex

Mešanico topil oziroma mobilno fazo smo degazirali s pomočjo ultrazvočne kadičke. Sephadex smo previdno vmešali v mešanico topil in ga v pokriti posodi pustili nabrekat 12 ur. Tako pripravljeno stacionarno fazo smo previdno, v eni potezi nalili v kolono. Enakomeren pretok mobilne faze smo zagotovili s črpalko in na vrh dodali še nekaj topila. Nato smo kolono zaprli in gel pustili posedati 8 ur. Tik preden se je nivo mobilne faze poravnal z nivojem stacionarne, smo nanesli vzorec SUB1, raztopljen v tolikšni količini topila, da je bila raztopina stabilna. Ko se je nivo raztopine poravnal z nivojem stacionarne faze, smo kolono napolnili z mobilno fazo in povečali pretok črpalke.

S: Vzorec okrog 15 mg frakcije s SUB1. Kot mobilno fazo smo uporabili DCM/MeOH/H₂O v razmerju 8/2/0,25. Uporabili smo 30 g Sephadexa LH-20®.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Izolacija spojin

4.1.1. Opis ekstraktov

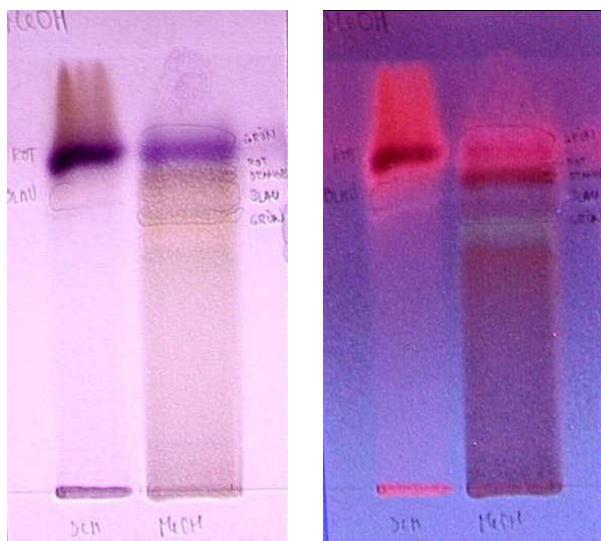
Diklorometanski ekstrakt je bil moten, temno zelen in pri sobni temperaturi trden. Ob odstranjevanju iz čaše se je uprašil. Pri redčenju z diklorometanom je bil rahlo lepljiv. Podatka o teži droge pred ekstrakcijo nismo imeli, zato nismo mogli določiti izkoristka ekstrakcije. Celokupna količina diklorometanskega ekstrakta je bila 3,65 g.

Metanolni ekstrakt je bil moten, temno rjav in pri sobni temperaturi trden do poltrden. Trdno se je prilepil na čašo, v kateri se je nahajal, in bil slabo krušljiv. Ob raztavljanju z metanolom je bil izredno lepljiv, zato smo sklepali, da vsebuje večje količine polisaharidov. Raztapljal se je počasi. Tudi tu podatka o količini droge nismo imeli. Celokupna količina metanolnega ekstrakta je bila 7,32 g.

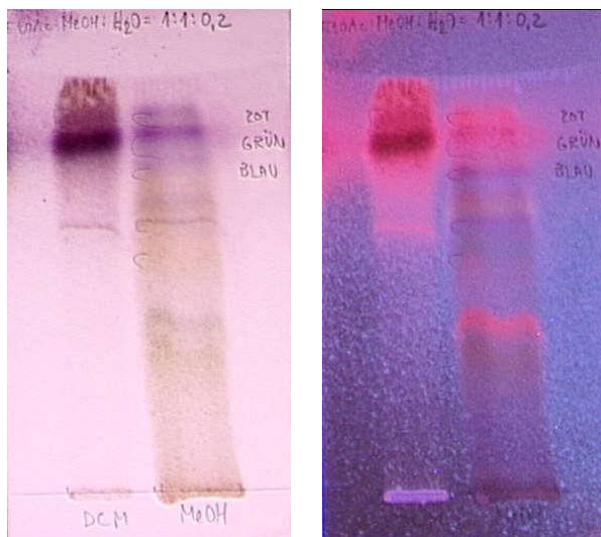
4.1.2. Optimizacija mobilne faze

Ločevanje ekstraktov smo pričeli z optimizacijo mobilne faze po metodah tankoplastne kromatografije. Za primerjavo DCM in MeOH ekstrakta smo vsakega ločeno raztopili v mobilni fazi enake sestave, nanesli na TLC ploščice in razvili kromatograme, prikazane na slikah 8 do 14. Pri polarnejših mobilnih fazah so komponente potovale previsoko. Opazili smo, da že zelo majhna količina metanola v mobilno fazo povzroči zelo velik skok vrednosti retencijskega faktorja. Dodatek vode ni povzročil tako velikih razlik.

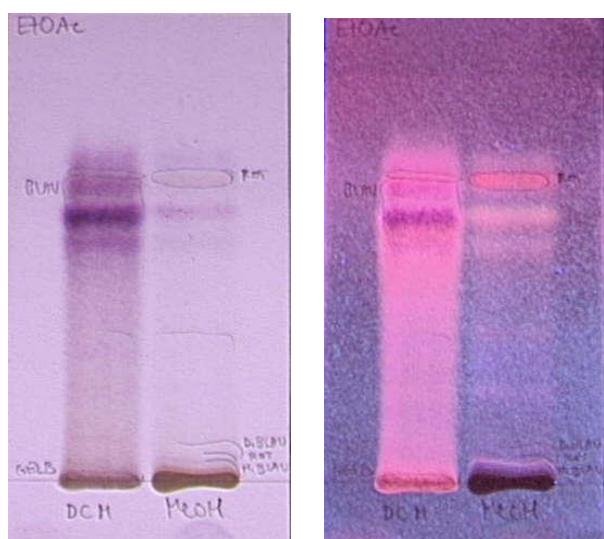
Komponente diklorometanskega ekstrakta so izkazovale dobro topnost v nepolarnejših topilih. V metanolu so se kljub uporabi ultrazvočne kadičke raztapljale zelo počasi. Polarnejše mobilne faze, ki so vsebovale etilacetat, metanol ali vodo, so na kromatogramih povzročile nastanek repov in brad, oziroma razporeditev komponent po celi fronti. Posamezne lise se tako niso jasno ločile med sabo. Sklepamo lahko, da se mnoge spojine v polarnejših topilih niso dobro raztopile. Za raztavljanje je preko starta moralo preteči veliko topila in snov se je razširila po večjem delu kromatograma. Polarnejše mobilne faze so zaradi večjih interakcij s silikagelom tudi počasneje potovale po kromatogramu. Vzorci so zato bili več časa v stiku z mobilno fazo in so imeli več časa za difuzijo.



Slika 8. TLC razvit v DCM/MeOH/H₂O (70/30/3), DCM in MeOH ekstrakt, VIS (levo) in UV-366 nm (desno)



Slika 9. TLC razvit v EtOAc/MeOH/H₂O (5/5/1), DCM in MeOH ekstrakt, VIS (levo) in UV-366 nm(desno)



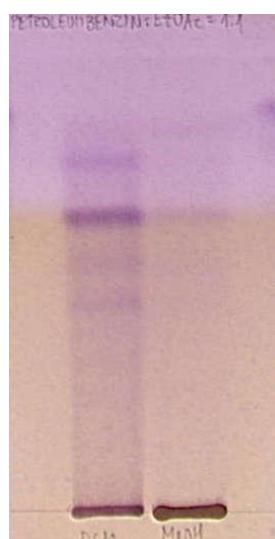
Slika 10. TLC razvit v EtOAc, DCM in MeOH ekstrakt, VIS (levo) in UV-366 nm(desno)



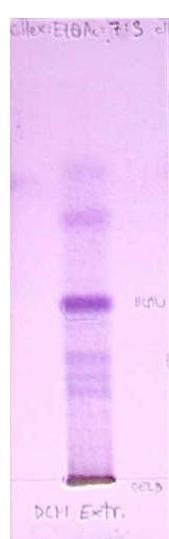
Slika 11. TLC razvit v cHex, DCM in MeOH ekstrakt, VIS



Slika 12. TLC razvit v DCM/MeOH (9/1), DCM in MeOH ekstrakt, VIS



Slika 13. TLC razvit v EtOAc/petroleter (1/1), DCM in MeOH ekstrakt, VIS

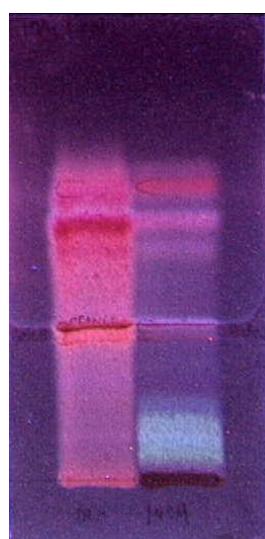


Slika 14. TLC razvit v cHex/EtOAc (7/3), DCM ekstrakt, VIS

Dodatek kisline (sliki 15 in 16) v različne mobilne faze ločbe ni izboljšal. Spremenil je le obliko in zaznavnost dveh lis, iz česar bi lahko sklepali, da dve komponenti v ekstraktih spremenjata lastnosti ob prisotnosti kislin. Iz komaj zaznavnih, razvlečenih lis pod UV-265 nm sta nastali temno rjavi, ozki z ostrimi robovi na vidni svetlobi. Ob dodatku kisline sta prepotovali enako pot kot v mobilni fazi brez dodatka. Zato smo sklepali, da imata komponenti kisle lastnosti.



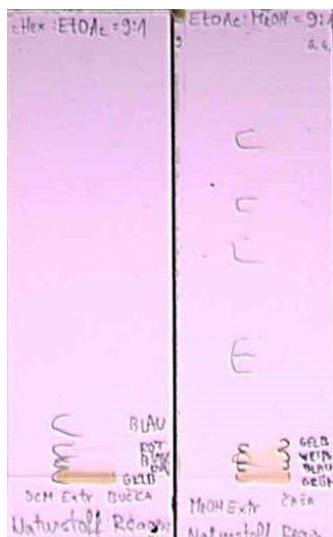
Slika 15. TLC razvit v nakisanem EtOAc, DCM in MeOH ekstrakt, VIS (levo) in UV-366 nm (desno)



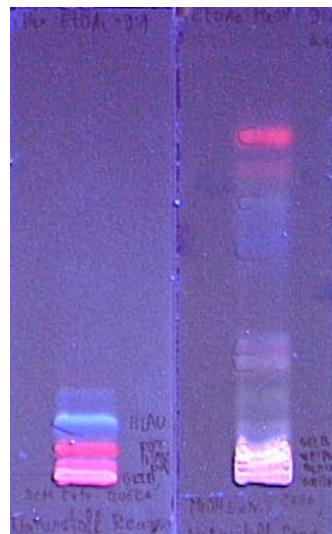
Slika 16. TLC razvit v nakisanem EtOAc/petroleter (1/1), DCM in MeOH ekstrakt, VIS (levo) in UV-366 nm (desno)

4.1.3. Izbira orositvenega reagenta

Z naturstoff/PEG reagentom (sliki 17 in 18) so določene lise pod svetilko valovne dolžine 366 nm fluorescirale v različnih barvah. Rdeče lise bi lahko pripisali klorofilu, modre derivatom kavne kisline, rumene in bele pa flavonoidom.

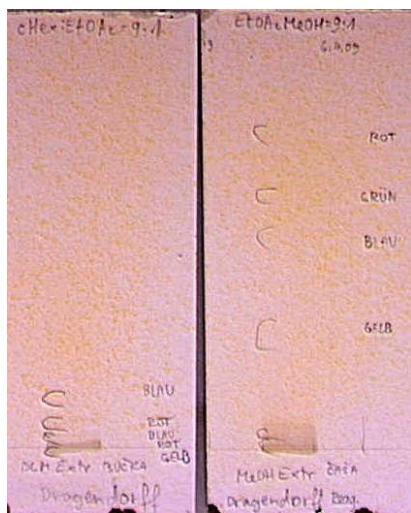


Slika 17. TLC plošči razviti v različnih mobilnih fazah: DCM ekstrakt (levo) v cHex/EtOAc (9/1), in MeOH ekstrakt (desno) v EtOAc/MeOH (9/1), VIS, 'naturstoff' reagent

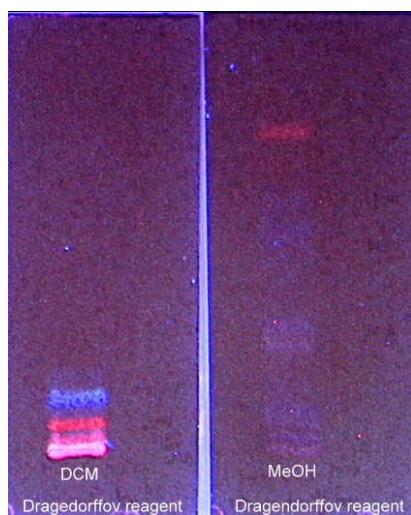


Slika 18. TLC plošči razviti v različnih mobilnih fazah: DCM ekstrakt (levo) v cHex/EtOAc (9/1), in MeOH ekstrakt (desno) v EtOAc/MeOH (9/1), UV-366 nm, 'naturstoff' reagent

Dragendorffov reagent je specifični reagent za alkaloide. Ker na vidni svetlobi ni bilo videti rjavo-rdečih lis smo zaključili, da v ekstraktih ni prisotnih alkaloidov v večjih količinah (sliki 19 in 20).



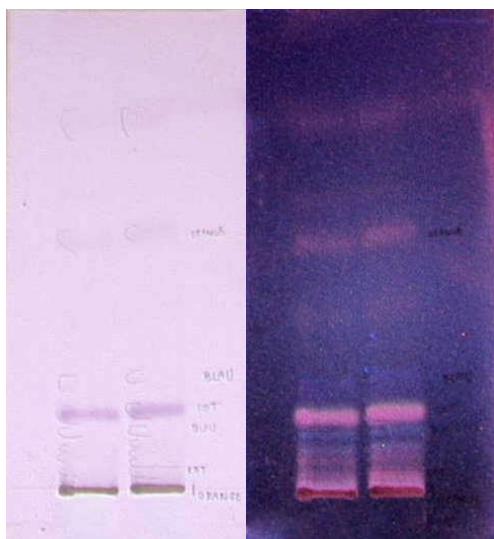
Slika 19. TLC plošči razviti v različnih mobilnih fazah: DCM ekstrakt (levo) v cHex/EtOAc (9/1), in MeOH ekstrakt (desno) v EtOAc/MeOH (9/1), VIS, Dragendorffov reagent



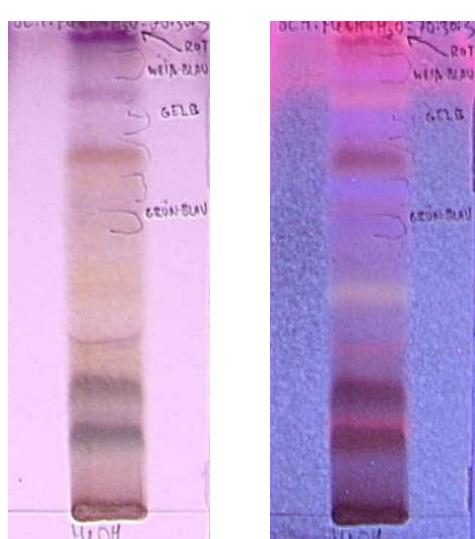
Slika 20. TLC plošči razviti v različnih mobilnih fazah: DCM ekstrakt (levo) v cHex/EtOAc (9/1), in MeOH ekstrakt (desno) v EtOAc/MeOH (9/1), UV-366 nm, Dragendorffov reagent

Obarvane produkte z anisaldehidom tvorijo predvsem funkcionalne skupine z dvojnimi vezmi in cikličnimi estri. Po orositvi so se na kromatogramih pojavile dobro vidne vijolične lise. Pod UV-366 nm so bile roza-vijolične barve, zato smo sklepali, da v ekstraktu prevladujejo triterpenoidne ali strukturno podobne substance. Ker je bil naš cilj izolacija le-teh, smo za najoptimalnejši orositveni reagent izbrali anisaldehid. Pojav modrih lis pod svetilko pri valovni dolžini 366 nm bi lahko pripisali derivatom kavne kisline.

Odločili smo se začeti z DCM ekstraktom. Na kromatogramu je bilo opaziti intenzivne in ostre vijolične lise. Ocenili smo, da jih bo najlažje izolirati. Zaradi majhne količine razpoložljivih ekstraktov smo se namreč morali osredotočiti na izolacijo spojin, ki jih bo dovolj za detekcijo in vrednotenje z NMR. Kot najoptimalnejšo mobilno fazo za adsorpcijsko kromatografijo smo izbrali DCM, saj so bile lise pregledno in enakomerno razporejene po kromatogramu.



Slika 21. TLC razvit v DCM, DCM ekstrakt, VIS in UV-366 nm, anisaldehid



Slika 22. TLC razvit v DCM/MeOH/H₂O (70/30/3), MeOH ekstrakt, VIS in UV-366 nm

Če bi se odločili raziskati tudi metanolni ekstrakt, bi za začetek uporabili mobilno fazo DCM/MeOH/H₂O v razmerju 70/30/3. Za metanolni ekstrakt se nismo odločili, ker z nobeno od mnogih preizkušenih mobilnih faz nismo dosegli dobre ločljivosti. S spremenjanjem polarnosti se retencijski faktorji niso veliko spreminali. Nekatere komponente so se razporedile po vsej poti fronte, kar bi motilo izolacijo tistih, ki so se ločile dobro. Lise, ki so pred oroševanjem z anisaldehidom pod UV-366 fluorescirale belo in rumeno, bi lahko pomenile prisotnost flavonoidov, modre derivate kavne kisline, zelena pa saponine.

4.1.4. Izolacija

Ločevanje smo pričeli z metodo VLC1. Z njo smo diklorometanski ekstrakt v grobem ločili na posamezne frakcije. Na ta način smo iz njega odstranili polarnejše komponente. Eluirali smo z diklorometanom, ki je na TLC ploščah dal močno, dobro ločeno liso z retencijskim faktorjem 0,17. Vsebnost frakcij smo preverili na TLC kromatogramih. Iz njih je lepo razvidno dvigovanje polarnosti komponent z vsako naslednjo frakcijo. Frakcija 1 je iz kromatografske kolone pripravljala prva, torej je vsebovala najbolj nepolarne snovi. Na koncu smo za spiranje polarnejših komponent, ki so se zadržale na vrhu kolone uporabili metanol. Kromatografsko kolono med ekstrakcijo prikazuje slika 23. Lepo je vidna frakcionacija nanešenega ekstrakta v stacionarni fazi.

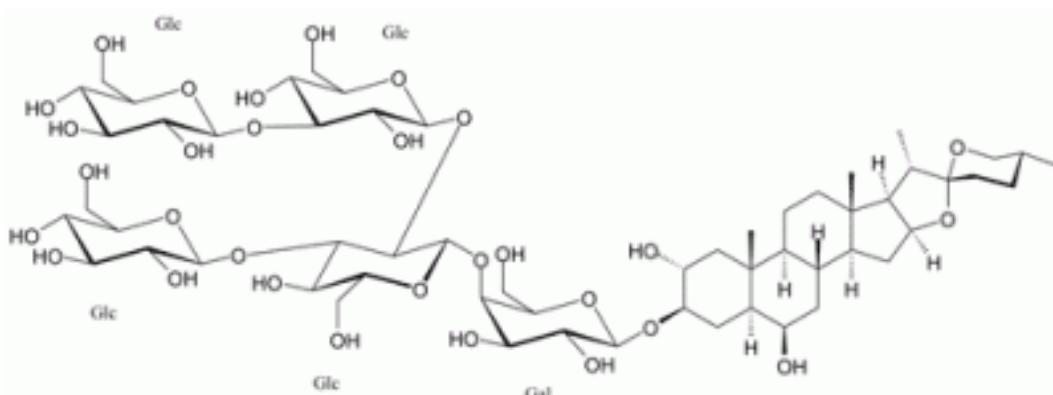


Slika 23. VLC kolona med postopkom izolacije

Potovanje mobilne faze je bilo kljub enakim pogojem z vsakim eluiranjem počasnejše. Na vrhu kolone se je ustvaril čep ostankov diklorometanskega ekstrakta, ki je na koncu kljub uporabi metanola in vakuma popolnoma ustavil potovanje mobilne faze.

Vzrokov za zamašitev kolone je lahko veliko. Eden je močna ohladitev kolone zaradi uporabe vakuumsko črpalke. V dokaz so se okrog zunanjih sten kolone nabrali ledeni kristali. To je zmanjšalo topnost snovi v diklorometanu. Kljub temu spiranje z metanolom in čakanje, da se kolona segreje nista pomagala. Najverjetneje gre vzroke pripisati naravi določenih komponent v zmesi. Sklepamo lahko, da so se v diklorometanskem ekstraktu nahajale tudi polarnejše snovi. Zaradi velike razlike med polarnostima silikagela in

diklorometana so se močno adsorbirale na silikagel ter z določenimi interakcijami povezale tudi med sabo. Sprati jih ni bilo možno niti z metanolom. Težave bi lahko predvideli, saj so bile na TLCjih po oroševanju z anisaldehidom vidne rjave lise, ki so vedno ostale na startu. Lise, ki so na TLCju diklorometanskega ekstrakta potovale višje, so se po oroševanju z anisaldehidom obarvale vijolično. Suh silikagel na vrhu kolone VLC1 med izolacijo je bil bele barve. Ko smo ga omočili, so se pokazale zelene plasti različnih odtenkov. V literaturi omenjajo oroševanje vzorca na TLC plošči z vodo do pojava obarvanih lis in vijolično obarvanje z anisaldehidnim reagentom za detekcijo saponinov. Saponini so raznolika skupina substanc, ki jo najdemo v vseh rastlinah. Sestavljeni so iz triterpenskega, steroidnega ali steroidno alkaloidnega aglikona, na katerega so vezani sladkorji (slika 24). Topni so v polarnih topilih. Znano je, da skupaj s steroli tvorijo težko razgradljive komplekse.

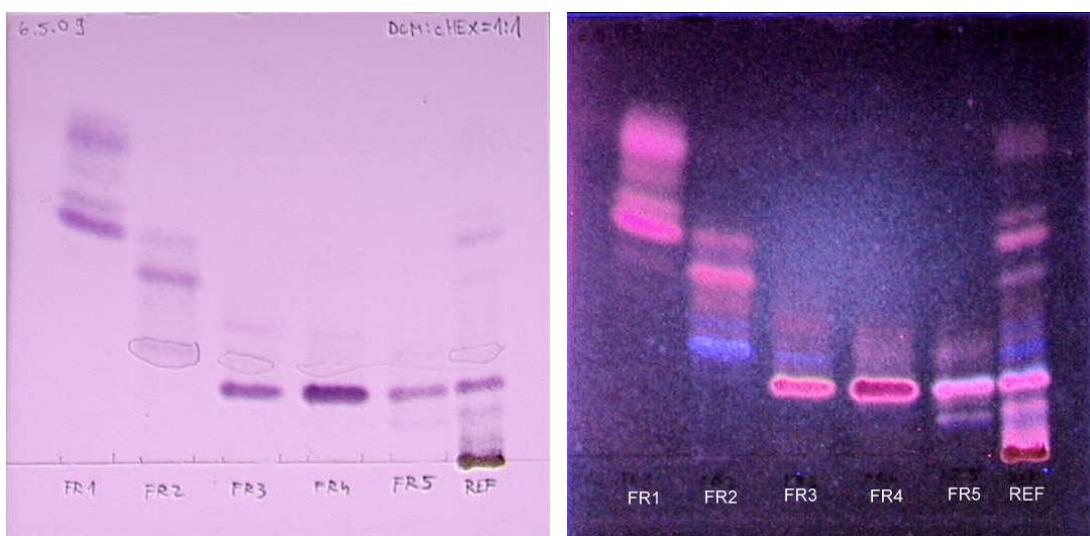


Slika 24. Primer saponinske strukture

Lepljivost bi bilo mogoče pripisati polisaharidnim verigam saponinov. Možen je tudi razpad saponinov na silikagelu na aglikonski del in sladkorje. Sladkorji so se zaradi polarnosti in lepljivosti zadržali na startu, aglikoni pa so potovali z mobilno fazo, kar bi lahko povečalo njihovo količino v zbranih frakcijah. Potovanje mobilne faze je dodatno poslabšala zamašitev frite, ki je otežila spiranje kolone na njenem spodnjem delu, kar smo videli pri pranju kolone po končani metodi. Sklepamo, da je tudi to posledica narave spojin v vzorcu. Smiselno bi bilo uporabiti frito z večjimi porami. Zamašila bi se lahko tudi zaradi delcev silikagela, ki so prodrli v njene morda prevelike pore - to bi lahko preprečili z okroglim kosom vate, vstavljenim med frito in silikagel.

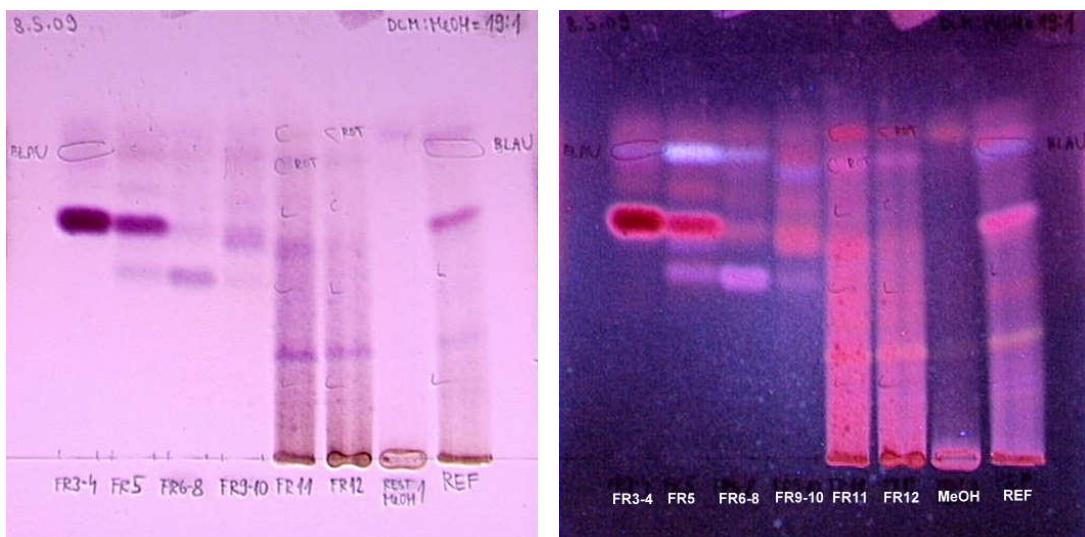
Metoda se je kljub težavam na koncu izkazala za ustrezno, saj smo z njo uspešno dobili nepolarnejše frakcije. Zaradi majhne količine začetnega materiala naš cilj namreč ni bil optimizacija metode izolacije. Za nadaljnje raziskovanje vsebnosti diklorometanskega ekstrakta metoda ne bi bila primerna. Za izolacijo polarnejših komponent bi morali ubrati drugo pot. Predlagamo, da bi ekstrakt porazdelili med dve topili v lijločniku. Uporabili bi polarnejši n-butanol in nepolarnejši cikloheksan. Nepolarne komponente bi se porazdelile v cikloheksan, ki bi ga odparili ter z vzorcem nadaljevali po metodi VLC1. Polarnejše bi prešle v n-butanol. Ločbo le-teh bi nadaljevali z uporabo polarnejših topil. Seveda bi te teorije lahko potrdili le po empirični poti ali s poznavanjem točne sestave zmesi diklorometanskega ekstrakta.

Največjo prednost VLC kolone smo prepoznali v njeni hitrosti. Vakumska črpalka je pospešila potovanje mobilne faze, kolona pa se je po odtekli mobilni fazi smela osušiti. Tako ni bila potrebna nenehna skrb za dodajanje mobilne faze. Zbirali smo nanesene frakcije v celoti, s čimer smo se izognili zamudnemu lovljenju kapljic, ki ga poznamo pri navadni koloni. Več dela je bilo samo s pripravo vzorca, predadsorbiranega na silikagel.



Slika 25. TLC razvit v DCM/cHex (1/1), frakcije 1-5 po VLC1, VIS in UV-366 nm

Iz kromatogramov je bilo razvidno, da so bile nekatere dobljene frakcije enake sestave. Združili smo jih v FR3-4, FR6-8 ter FR9-10 (slika 26).



Slika 26. TLC razvit v DCM/MeOH (19/1), združene frakcije 3-12 po VLC1, VIS in UV-366 nm

Tako smo povečali maso vzorcev za nadaljnje delo. Topilo smo iz bučk odparili z rotavaporjem. Pri tem velja omeniti, da smo tlak nastavili na atmosferski, saj je diklorometan dobro hlapna tekočina že pri sobni temperaturi (22°C) in normalnem tlaku (1 bar). Uporaba prenizkega tlaka lahko povzroči penjenje vsebine bučke ter prehod vzorca iz bučke v rotavapor, zato je potrebno spremljati dogajanje v bučki. Ko smo odparevali metanol v kombinaciji z diklorometanom, smo najprej odparevali pri atmosferskem tlaku. Nato smo postopoma zniževali tlak, da je izhlapel še metanol. Njegova visoka hlapnost nam je koristila pri prenašanju vzorca v steklene vsebnike za shranjevanje. Vsebino bučke smo raztopili v diklorometanu in raztopino s kapalko prenesli v stekleni vsebnik. Od tam smo diklorometan odstranili z vpihanjem šibkega toka zraka, usmerjenega na gladino raztopine v vsebniku. Vzorca v suhi obliki ni bilo možno prenašati, saj bi prišlo do prevelikih izgub. Trdno se je namreč prilepil na stene posode ter na spatulo.

Tehtali smo z analizno tehnicco Sartorius research R160P in elektronsko tehnicco Sartorius MC1. Masni deleži so zbrani v preglednici V.

Primer računanja masnega deleža frakcije glede na diklorometanski ekstrakt:

$$W_{FR3-4} = \frac{m_{FR3-4}}{m_{ekstrakta}} = \frac{0,08984\text{ g}}{1\text{ g}} \rightarrow 8,9\%$$

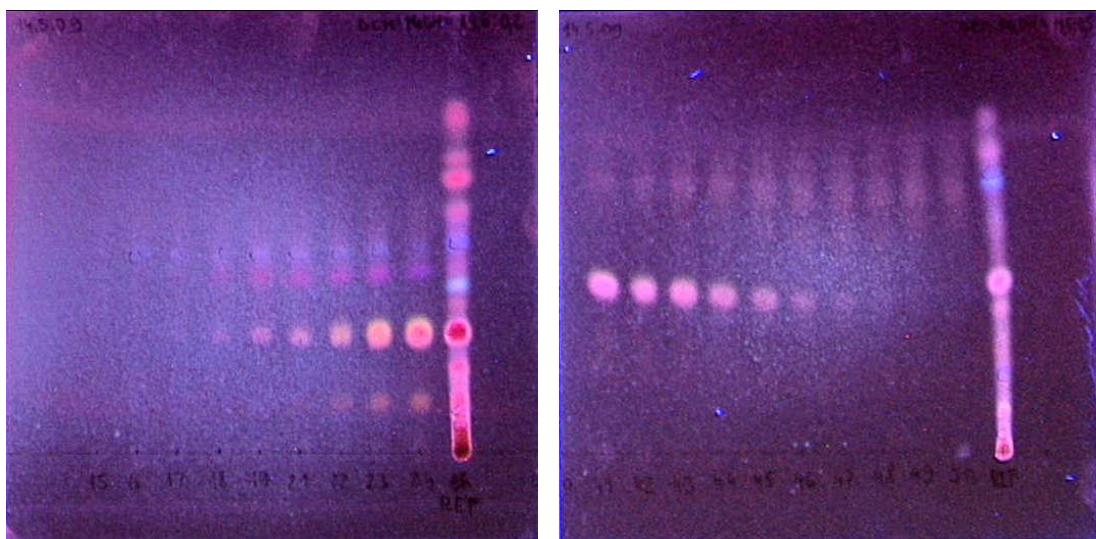
Preglednica VI. Mase frakcij, dobljenih iz DCM ekstrakta po metodi VLC1

Metoda VLC1 iz 1 g DCM ekstrakta		
zbrane frakcije	mase zbranih frakcij	masni delež
FR1	64,68 mg	6,5 %
FR2	30,93 mg	3,1 %
FR3-4	89,84 mg	8,9 %
FR5	12,11 mg	1,2 %
FR6-8	24,76 mg	2,5 %
FR9-10	26,70 mg	2,7 %

Izkoristek ekstrakcije:

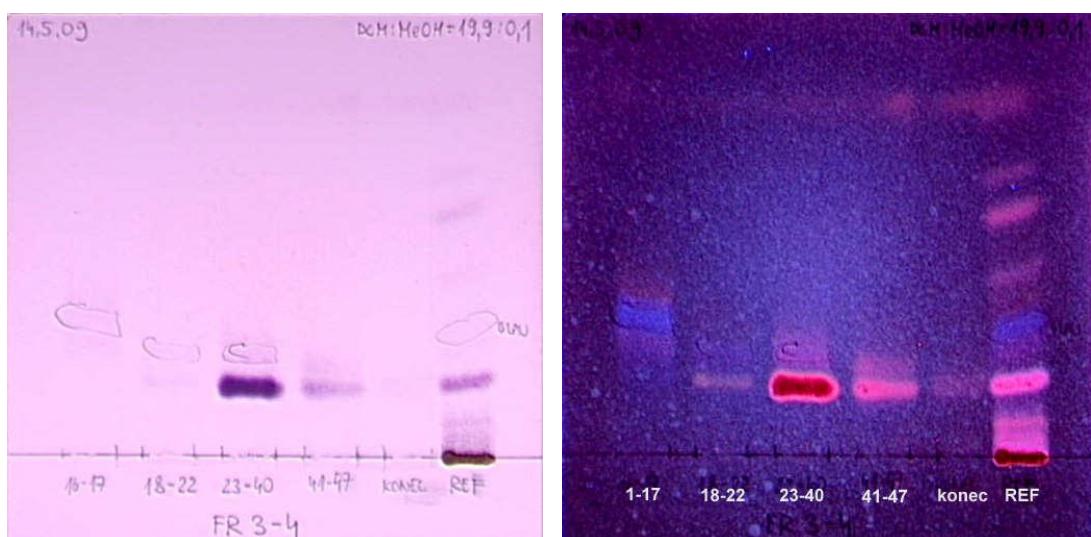
$$\nu_{VLC1} = \frac{m_{vseh\ frakcij}}{m_{ekstrakta}} = \frac{0,24902\ g}{1\ g} \rightarrow 24,9\ %$$

Največje izgube so nastale zaradi zgoraj opisanega zastajanja komponent na silikagelu in zamašitve frite. Največja po masi je bila FR3-4 (slika 26). Na kromatogramu se je pri vidni svetlobi ter pod UV svetilko pokazala intenzivna lisa, ločena od ostalih, zato smo ločbo nadaljevali z njo. Pri tem smo se poslužili metode navadne kolonske kromatografije. Metodo smo poimenovali CC1. Kot medij stacionarne faze smo uporabili silikagel, ki predstavlja stacionarno fazo tudi na TLC plošči. Ob uporabi enake mobilne faze smo zato pričakovali približno enako in uspešno ločbo. Po pričakovanjih je ciljana komponenta iz kolone pripravljala zadnja. Kljub temu je iz slike 27 razvidno, da ločba ni bila uspešna, saj so se nekatere lise nahajale v vseh frakcijah. Sklepali smo, da smo uporabili prekratko kolono in premalo polarno topilo. Zaradi tega je mobilna faza prehitro stekla skozi silikagel, komponente pa se niso imele časa porazdeliti.



Slika 27. TLCja razvita v DCM/MeOH (198/2), frakcije 15-29 in 41-50 po CC1, UV-366 nm

Največ SUB1 je bilo v frakcijah 23-40 (slika 28).



Slika 28. TLC razvit v DCM/MeOH (199/1), združene frakcije po CC1, VIS in UV-366 nm

Masni delež frakcije 23-40 glede na diklorometanski ekstrakt:

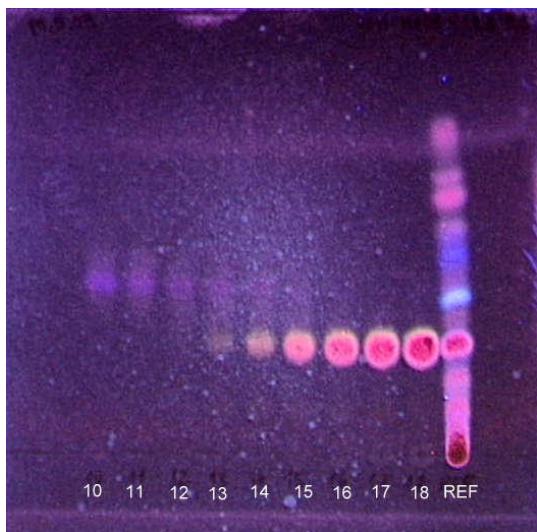
$$W_{FR3-4(23-40)} = \frac{m_{FR3-4(23-40)}}{m_{ekstrakta}} = \frac{0,06573 \text{ g}}{1 \text{ g}} \rightarrow 6,5\%$$

Masni delež dobljene frakcije glede na količino nanešenega vzorca:

$$v_{CC1} = \frac{m_{FR3-4(23-40)}}{m_{nanešenega vzorca}} = \frac{0,06573 \text{ g}}{0,08984 \text{ g}} \rightarrow 73,2 \%$$

Ostale frakcije so predstavljale zanemarljivo majhen del vzorca. Čeprav jih nismo stehtali, smo vseeno ocenili izkoristek. Izgube so bile majhne, kar je kazalo na ustreznost silikagela kot stacionarne faze. Največje izgube so verjetno nastale že pri samem nanašanju vzorca. Potrebno bi ga bilo nanesti v najmanjšem možnem volumnu, da se je na silikagel adsorbiral bolj koncentriran. Tako bi izboljšali ločljivost. Ostanka raztopine, ki se prilepi na stene vsebnika in kapalke zato ni priporočljivo spirati in nanašati na kolono naknadno. Ker smo imeli na voljo zelo majhne količine vzorca, smo le-to storili, kar bi lahko bil drugi vzrok neuspešne ločbe.

Izolacijo SUB1 smo nadaljevali po metodi CC2. Uporabili smo podobno metodo kot v prejšnjem poskusu, le da smo rahlo povečali kapaciteto kolone (količino silikagela) ter polarnost topila. Tako smo zvezčali razliko med retencijskimi faktorji posameznih komponent. Upočasnili smo tok mobilne faze, da bi izboljšali porazdelitev po silikagelu. Ločba je bila bolj uspešna. Od SUB1 smo uspeli odstraniti polarnejše komponente. Le-te so iz kolone prišle najprej, na TLCju jih je bilo zaznati do frakcije 17 (slika 29).



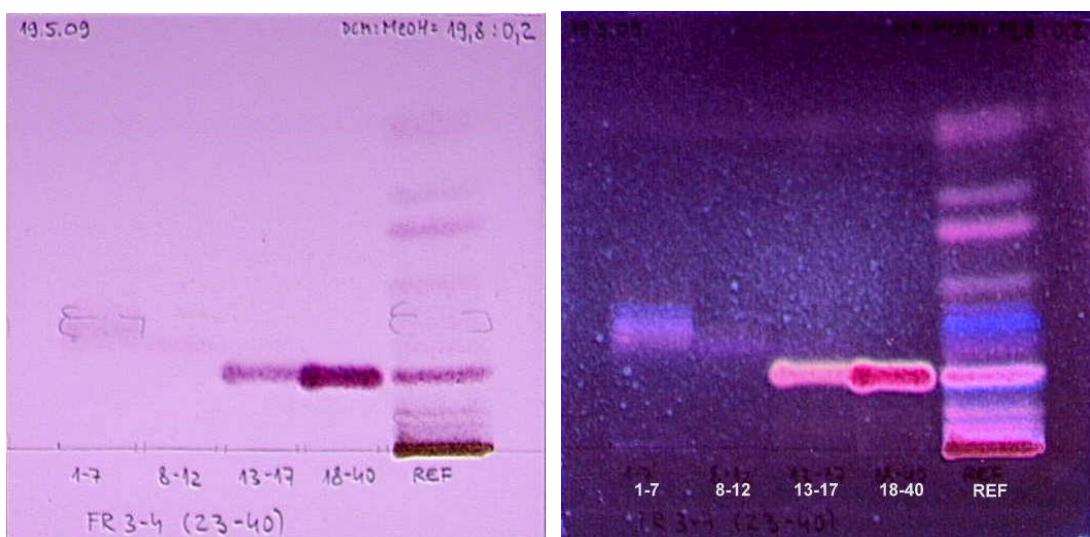
Slika 29. TLC razvit v DCM/MeOH (198/2), frakcije 10-18 po CC2, UV-366 nm

Naša komponenta se je nahajala v frakcijah 18-40 (slika 30). Na TLCju ni bilo opaziti primesi. Kazalo je, da smo izolirali čisto spojino.

Masni delež SUB1 glede na maso DCM ekstrakta:

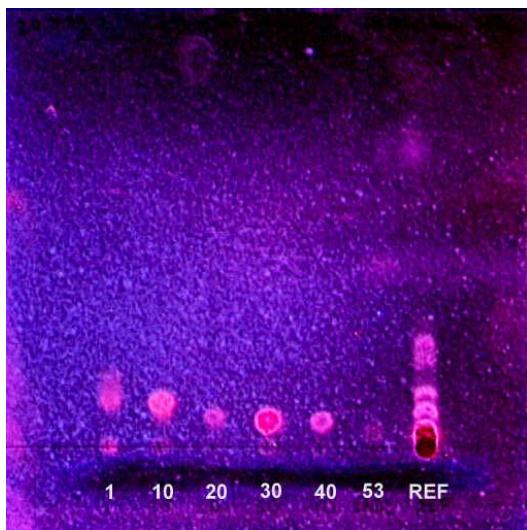
$$W_{\text{SUB1}} = \frac{m_{\text{FR3-4(23-40)}}}{m_{\text{ekstrakta}}} = \frac{0,03908 \text{ g}}{1 \text{ g}} \rightarrow 3,9 \%$$

Točnega izkoristka ekstrakcije po metodi CC2 nismo izračunali, saj je bila masa frakcij 1-17 zanemarljivo majhna. Glavna frakcija predstavlja približno 60 % delež nanesene frakcije. Če na podlagi lis na TLC plošči upoštevamo, da se v ostalih frakcijah nahajala vsaj četrtina dobljene mase, lahko zaključimo, da je izkoristek dober.

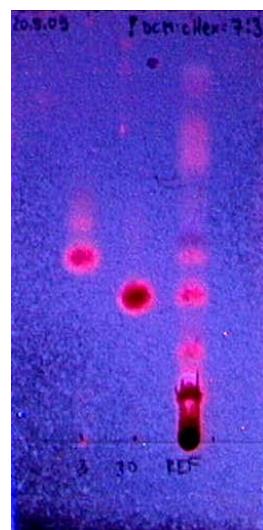


Slika 30. TLC razvit v DCM/MeOH (198/2), združene frakcije po CC2, VIS in UV-366 nm

Izolacije SUB2 smo se lotili na podoben način po metodi CC3. Substance v tej frakciji so bile zelo nepolarne, zato je optimalen retencijski faktor dala mobilna faza DCM/cHex v razmerju 3/7. Po razvijanju TLC plošč dobljenih frakcij sprva nismo bili prepričani v uspešnost ločbe. Razlike v retencijskih faktorjih komponent so bile tako majhne, da bi lahko šlo za isto komponento in neenakomerno fronto mobilne faze (slika 31). Pri uporabi mobilne faze DCM/cHex v razmerju 7:3 se je razlika retencijskih faktorjev povečala (slika 32). To nam je potrdilo, da je bila ločba uspešna. Dobili smo SUB2.



Slika 31. TLC razvit v DCM/cHex (3/7), frakcije 1-53 po CC3, UV-366 nm



Slika 32. TLC razvit v DCM/cHex (7/3), frakciji 8 in 30 po CC3, UV-366 nm

Masni delež SUB2 glede na diklorometanski ekstrakt:

$$W_{\text{SUB2}} = \frac{m_{\text{FR20-53}}}{m_{\text{ekstrakta}}} = \frac{0,00762 \text{ g}}{1 \text{ g}} \rightarrow 0,76 \%$$

Masni delež SUB2 v nanesenem vzorcu:

$$W_{\text{CC3}} = \frac{m_{\text{vseh frakcij}}}{m_{\text{nanešenega vzorca}}} = \frac{0,00762 \text{ g}}{0,06468 \text{ g}} \rightarrow 11,8 \%$$

Glede na to, da so frakcije 20-53 po oceni glede na lise na TLC plošči predstavljalne več kot polovico ekstrakta zaključimo, da je izkoristek ločbe CC3 slab. Do največjih izgub je verjetno prišlo pri prenašanju vzorca na kolono. Nekaj vzorca je ostalo v posodici, v kateri smo ga raztopili in v kapalki, s katero smo ga nanesli na kolono. Le-teh v tem primeru nismo spirali, da se ne bi ponovilo podobno kot pri metodi CC1, ko se komponente zaradi prevelikega volumna raztopine z vzorcem niso ločile.

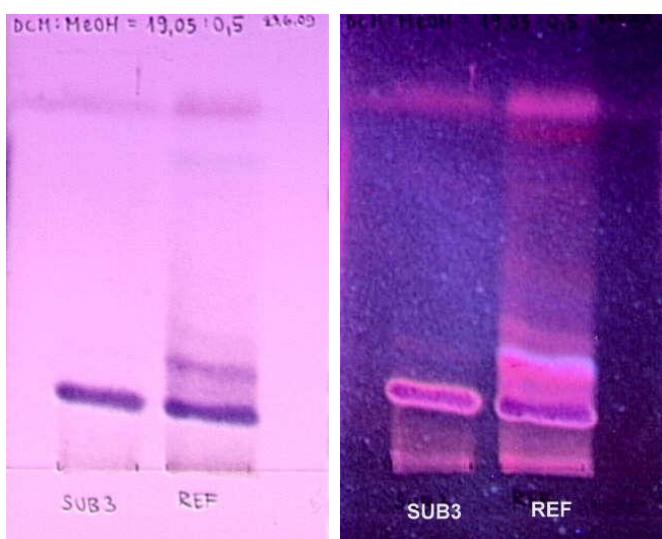
Substanco SUB3 smo izolirali po metodi CC4. Dobili smo zelo malo spojine glede na začetno maso diklorometanskega ekstrakta. Na TLCju je bilo opaziti nečistote. Z nadaljnjo izolacijo in identifikacijo zato nismo nadaljevali (slika 33).

Masni delež SUB3 glede na diklorometanski ekstrakt:

$$W_{\text{SUB3}} = \frac{m_{\text{SUB3}}}{m_{\text{ekstrakta}}} = \frac{0,00375 \text{ g}}{1 \text{ g}} \rightarrow 0,4 \%$$

Masni delež SUB3 glede na začetno količino nanešenega vzorca:

$$W_{\text{CC3}} = \frac{m_{\text{SUB3}}}{m_{\text{nanešenega vzorca}}} = \frac{0,00375 \text{ g}}{0,02476 \text{ g}} \rightarrow 15,1 \%$$



Slika 33. TLC razvit v DCM/MeOH (1905/5), SUB3 po CC4, VIS in UV-366 nm

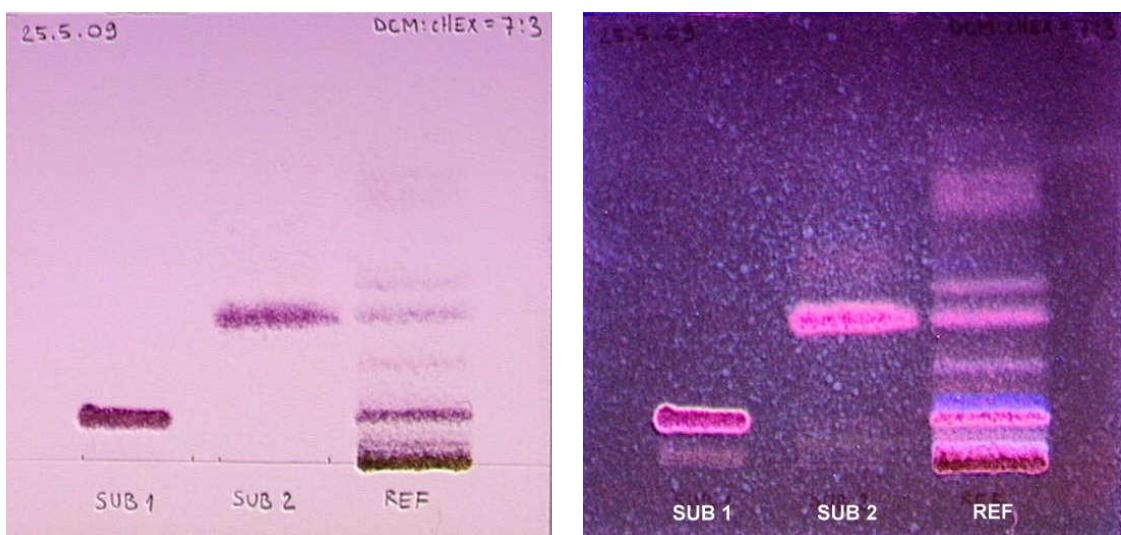
Tekom izolacije smo glede na potovanje lise po TLC plošči izračunali retencijske faktorje spojin. Primer računanja retencijskega faktorja za SUB1 v mobilni fazi DCM/MeOH v razmerju 19,8/0,2:

$$R_f = \frac{2,8 \text{ cm}}{9,0 \text{ cm}} = \rightarrow 0,31$$

Preglednica VII. Retencijski faktorji SUB1, SUB2 in SUB3

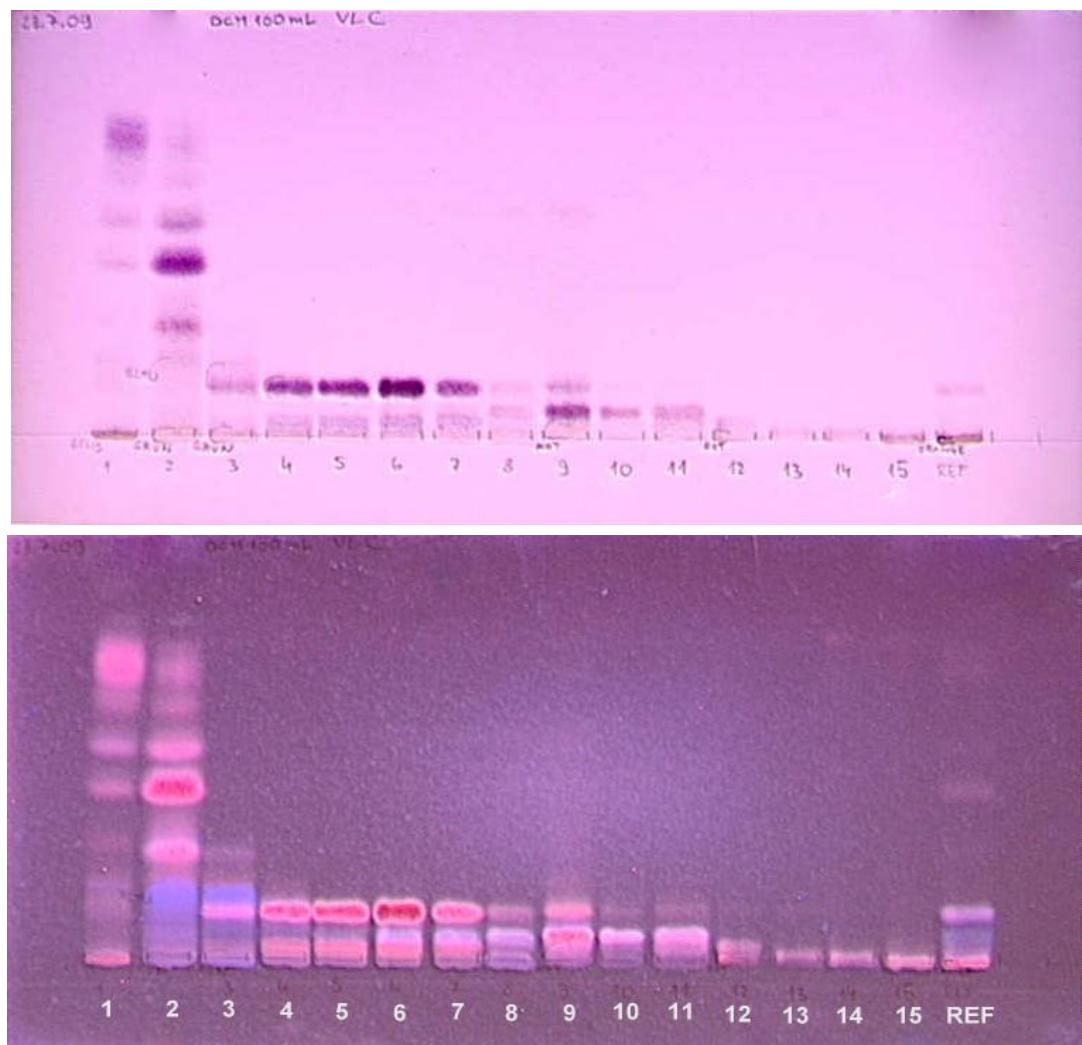
Mobilne faze	Retencijski faktor		
	SUB1	SUB2	SUB3
DCM/cHex (7/3)	0,10	0,32	0,05
DCM	0,17	0,40	0,06
DCM / MeOH (19,9 / 0,1)	0,20	0,57	0,08
DCM / MeOH (19,8 / 0,2)	0,31	0,66	0,10
DCM / MeOH (19,5 / 0,5)	0,36	0,72	0,13

R_f (SUB2) je bil najvišji, kar je pomenilo, da vzorec vsebuje najbolj nepolarne komponente. Le-te namreč tvorijo najmanjše interakcije s polarnim silikagelom ter najdlje potujejo z mobilno fazo (slika 34). Tudi frakcija s SUB2 je iz VLC kolone prišla prva. R_f SUB3 je najmanjši, torej so komponente v vzorcu najbolj polarne.



Slika 34. TLC razvit v DCM/cHex (7/3), SUB1 in SUB2, VIS in UV-366 nm

Ker smo sklepali, da gre za bolj ali manj čista vzorca, smo posneli masna spektra ter ^{13}C in ^1H NMR spektre vzorcev SUB1 in SUB2. Prikazani so v poglavju 4.2. Iz njih je bilo razvidno, da vzorca nista popolnoma čista, zato smo sklenili z ločbo nadaljevati. Za to smo potrebovali večje količine vzorcev. Ostalo nam je 2,65 g diklorometanskega ekstrakta. Začetno ločbo spojin na polarnejše in manj polarne smo izvedli z zgledovanjem po metodi VLC1. Za drugačen poskus izolacije se nismo odločili, ker smo imeli na voljo pre malo ekstrakta, z metodo VLC1 pa smo kljub težavam z nekaterimi komponentami iz zmesi uspešno izolirali nepolarnejše komponente. Metodo smo poimenovali VLC2. Velikost steklene kolone, količino silikagela in enkratne volumne mobilne faze smo prilagodili večji velikosti vzorca. Tudi v tem primeru se je kolona zamašila. Ker pri prvi metodi kolone nismo uspeli odmašiti z metanolom, smo tu kot mobilno fazo osmega eluata nanesli cikloheksan. Le-ta bi lahko spral morebitne nastale komplekse. Kolona je kljub temu ostala zamašena, zato smo nadaljevali z diklorometanom in od dvanajstih frakcij naprej z metanolom. Rezultati so bili podobni kot pri VLC1 (slika 35). Uspeli smo odstraniti polarnejše komponente zmesi.



Slika 35. TLC razvit v DCM, frakcije 1-15 po VLC2, VIS in UV-366 nm

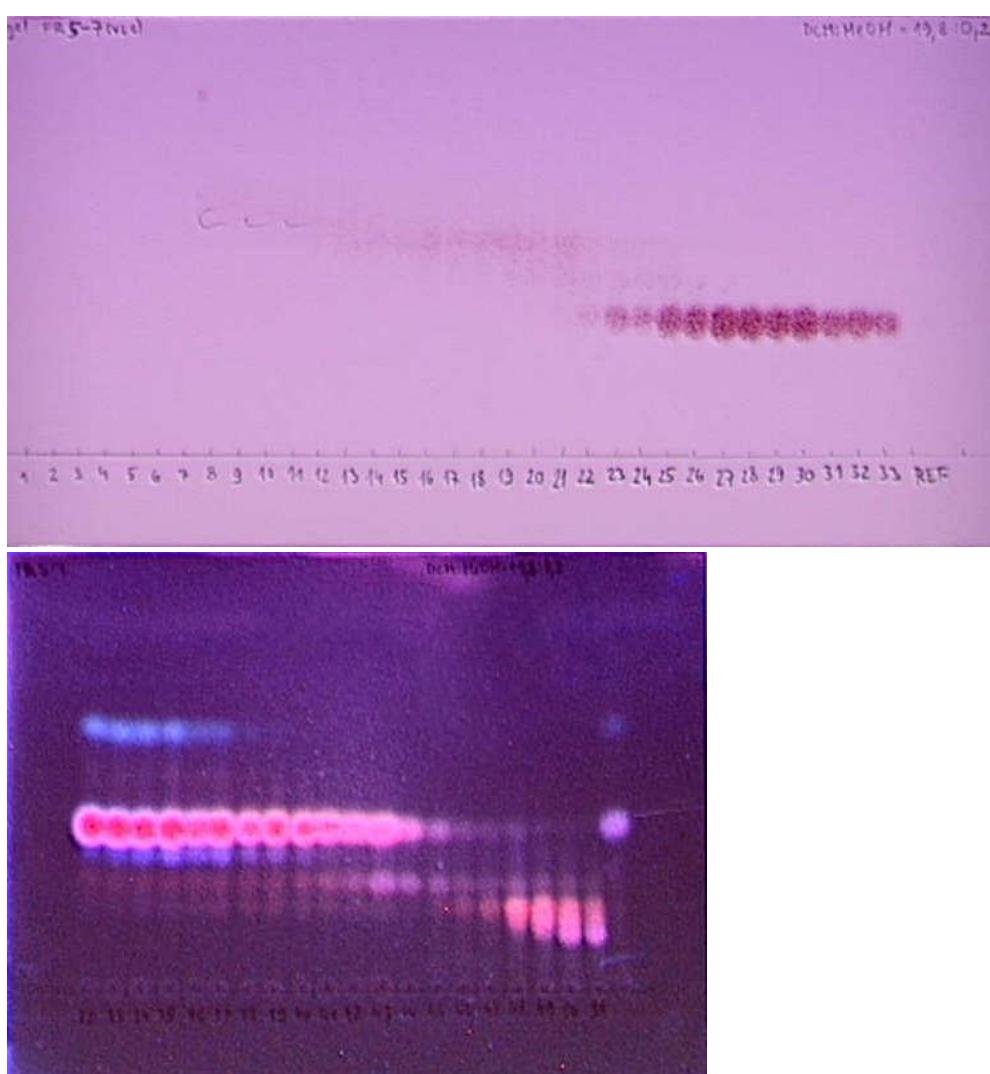
Preglednica VIII. Mase frakcij, dobljenih iz DCM ekstrakta po metodi VLC2

Metoda VLC1 iz 2,65 g DCM ekstrakta		
zbrane frakcije	mase zbranih frakcij	masni delež
FR1	171,65 mg	6,47 %
FR2	54,2 mg	2,04 %
FR3	19,93 mg	0,75 %
FR4	38,14 mg	1,43 %
FR5-7	256,03 mg	9,66 %
FR8	5,97 mg	0,22 %
FR9	51,7 mg	1,95 %
FR10	38,63 mg	1,45 %
FR11	12,88 mg	0,48 %

Računanje izkoristka ekstrakcije:

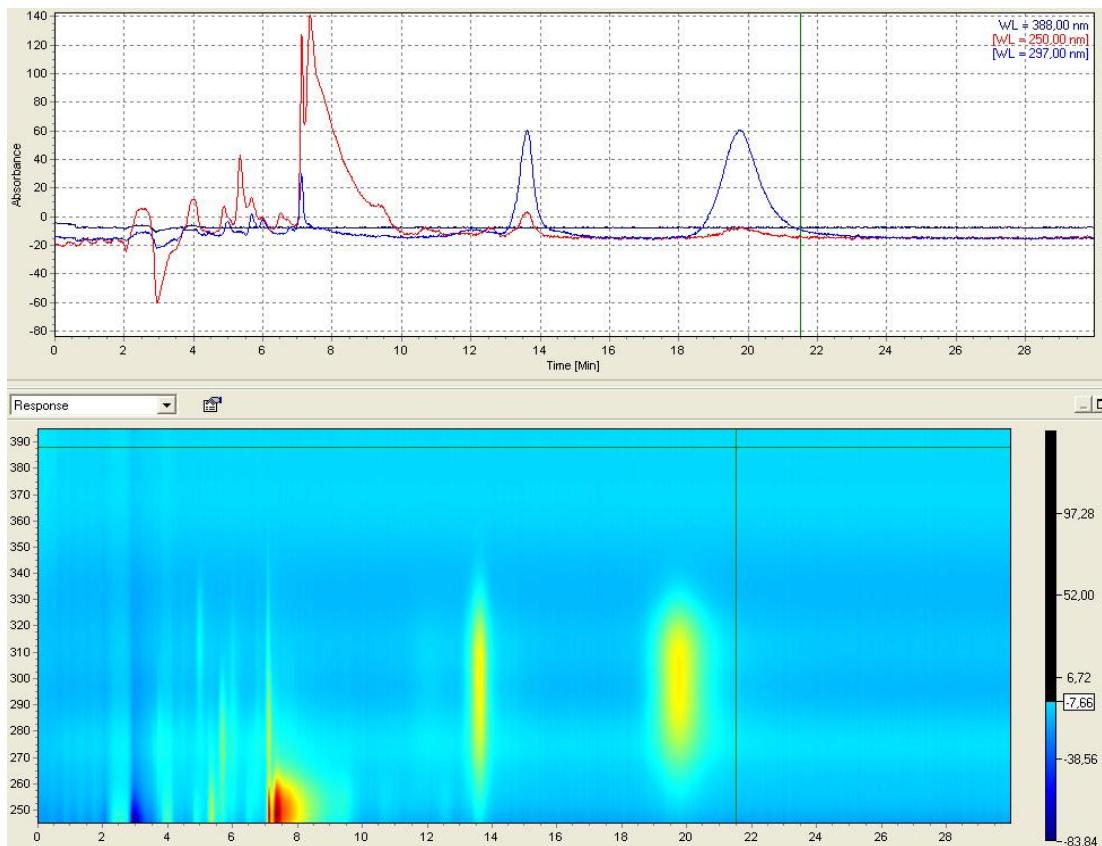
$$\nu_{VLC1} = \frac{m_{vseh\ frakcij}}{m_{ekstrakta}} = \frac{0,64913\ g}{2,65\ g} \rightarrow 24,4\ %$$

Masni delež glede na diklorometanski ekstrakt je bil podoben kot pri VLC1, kar pomeni, da je metoda ponovljiva. Nadaljevali smo po metodi CC5, pri čemer smo posnemali metodo CC2. Na TLC plošči (slika 36) je bilo opaziti več komponent, ki so se lepo ločile od naše, ena pa ji je bila tako blizu, da smo se odločili nadaljevati z natančnejšo metodo izolacije. Verjetno je šlo za komponento, ki je na TLCjih po metodi VLC1 nismo opazili. Morda smo nanašali premalo koncentrirane vzorce.



Slika 36. TLCja razvita v DCM/MeOH (198/2), po CC5, frakcije 1-33, VIS in frakcije 32-51, UV-366 nm

Ker smo za HPLC metode potrebovali manjše enkratne količine vzorcev frakcij nismo tehtali, ampak jih vzeli neposredno iz epruvet, v katere smo jih lovili. Rezultati, ki smo jih dobili z uporabo HPLC so bili pričakovano podobni tistim pri navadni kolonski kromatografiji (slika 37).

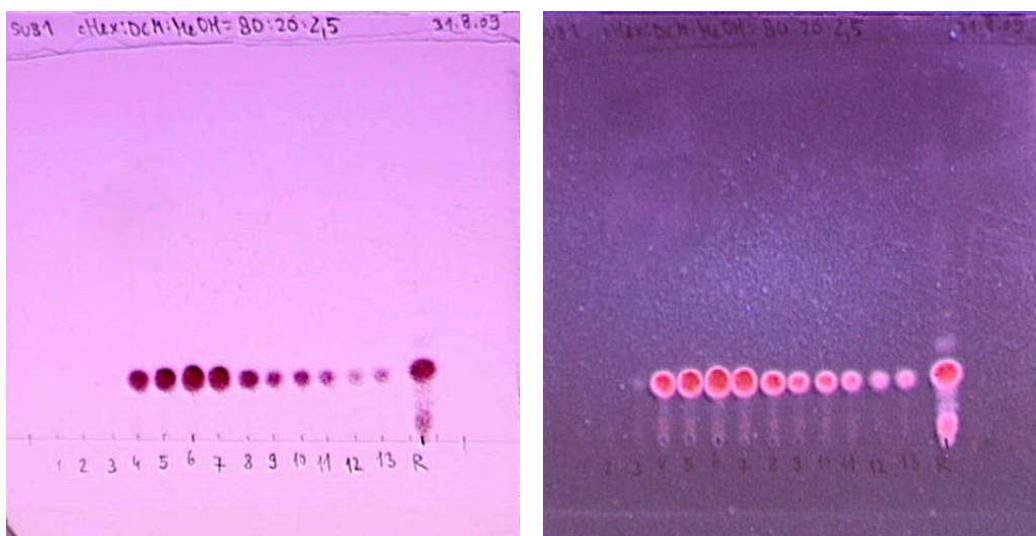


Slika 37. Kromatograma po metodi HPLC4, vzorec FR(5-7(32)), detekcija 245-350 nm)

Kot topili za mobilno fazo smo poleg metanola izbrali cikloheksan in kloroform. Topili imata absorpcijski maksimum pod 200 nm in tako nista motila detekcije naših nepolarnih komponent pri valovnih dolžinah 245 do 350 nm. Na kromatogramih je bilo videti vrhove spojin z dvojnimi vezmi. Zaradi sprotne detekcije absorbance smo imeli možnost spremljati kromatogram vzorca pri izhodu iz kolone. Na njem je bilo opaziti vrhove, ki so pripadali posameznim komponentam zmesi. To nam je pomagalo pri postavljanju meje med zbiranjem frakcij. Dve komponenti, ki sta absorbirali svetlobo pri 297 nm sta se lepo ločili, a ju je bilo premalo za določitev njunih struktur z NMR. Frakcije, ki so prišle iz HPLC kolone so bile zelo razredčene, kar je pomenilo velike izgube že pri njihovem združevanju in odparevanju topila. Sklepamo lahko, da bi bila izolacija teh dveh komponent uspešna tudi z navadno kolonsko kromatografijo. V primeru, da bi imeli več rastlinskega materiala lahko sklepamo, da bi uspeli dobiti vsaj dve čisti spojini. Ciljne

komponente je bilo dovolj, a ločitev ni bila uspešna. Njen vrh se je prekrival z vrhom, ki je verjetno pripadal že omenjeni strukturno zelo podobni substanci. Opaziti je bilo še druge vrhove. Vse preizkušene metode normalnofazne adsorpcijske kromatografije so se torej izkazale za neustrezne.

Kot zadnjo metodo smo preizkusili gelsko filtracijo z uporabo Sephadexa. Praktična izvedba je bila zelo podobna tisti pri kolonski kromatografiji s silikagelom. Previdnejši smo morali biti pri pripravi stacionarne faze, saj je bilo potrebno upoštevati koeficient nabrekanja, ki je na primer v diklorometanu 3,6 do 3,9 ml/g Sephadexa LH-20. Sephadex je bilo potrebno pred nanašanjem v stekleno kolono pustiti nabrekati v mobilni fazi. Če bi ga natresli direktno v kolono, bi lahko zaradi povečanja volumna po dodatku mobilne faze steklene stene kolone počile. Po neuspešni ločbi (sliki 38 in 39) smo lahko sklepali na zelo podobno velikost molekul v vzorcu.



Slika 38. TLC razvit v cHex/DCM/MeOH (32/8/1), frakcije 1-33 po S, VIS in UV-366 nm

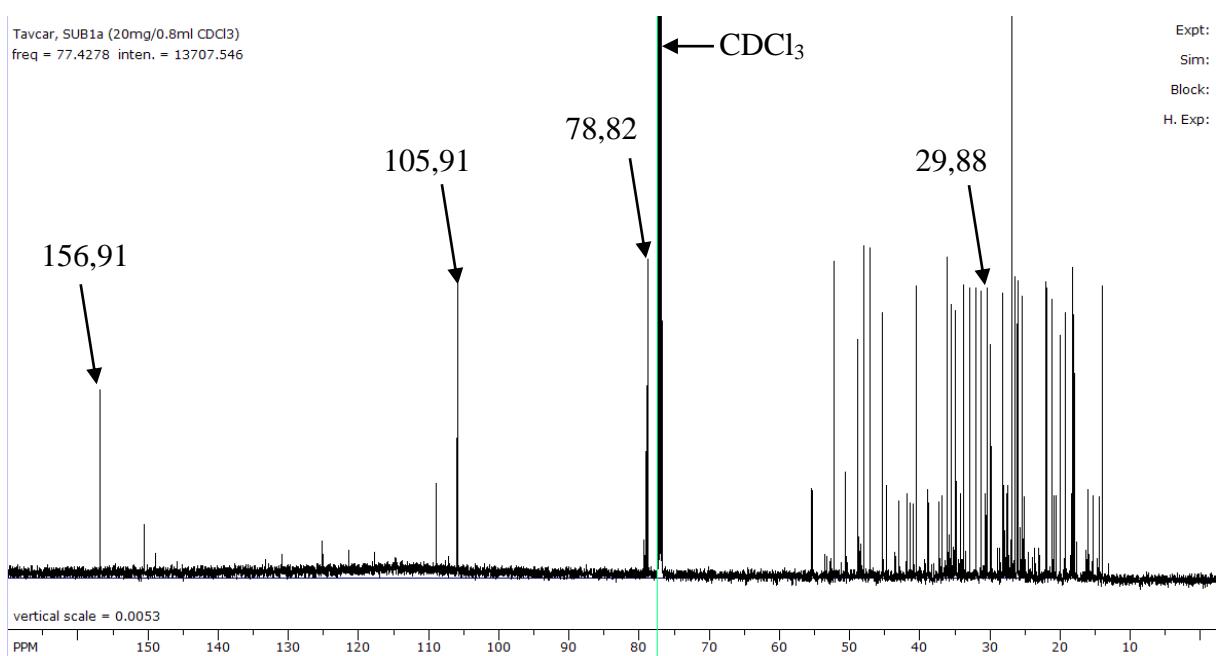


Slika 39. TLC razvit v cHex/DCM/MeOH (7/4/1), združene frakcije po S, VIS

4.2. Identifikacija spojin

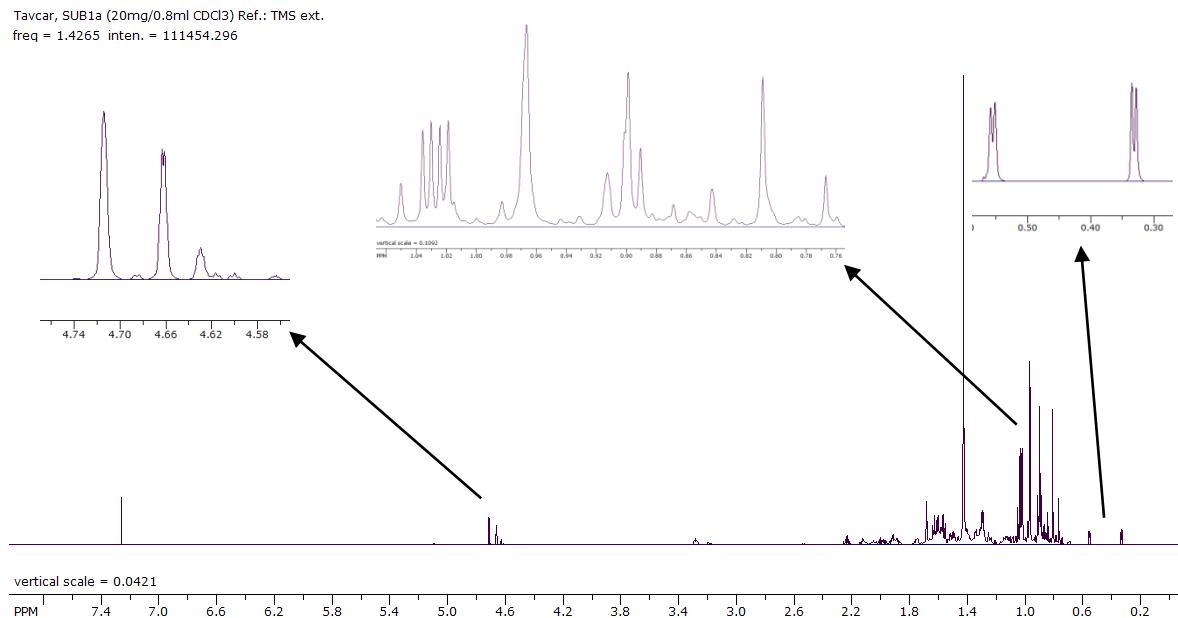
4.2.1. Struktura SUB1

Strukturo smo določili na podlagi masnega spektra in NMR spektrov: ^{13}C , ^1H , HSQC, HMBC, COSY in ROESY. Pomagali smo si z opisi spektrov podobnih spojin iz literature (38, 40, 41, 42). Na ^{13}C NMR spektru (slika 41) spojine SUB1 je razvidnih 31 vrhov podobne intenzitete. Vsak od teh signalov predstavlja posamezen v različno okolje umeščen C-atom molekule. Posebej izstopa signal topila CDCl_3 , ki se ne prekriva z nobenim od ostalih vrhov. Izbor topila je torej ustrezen.

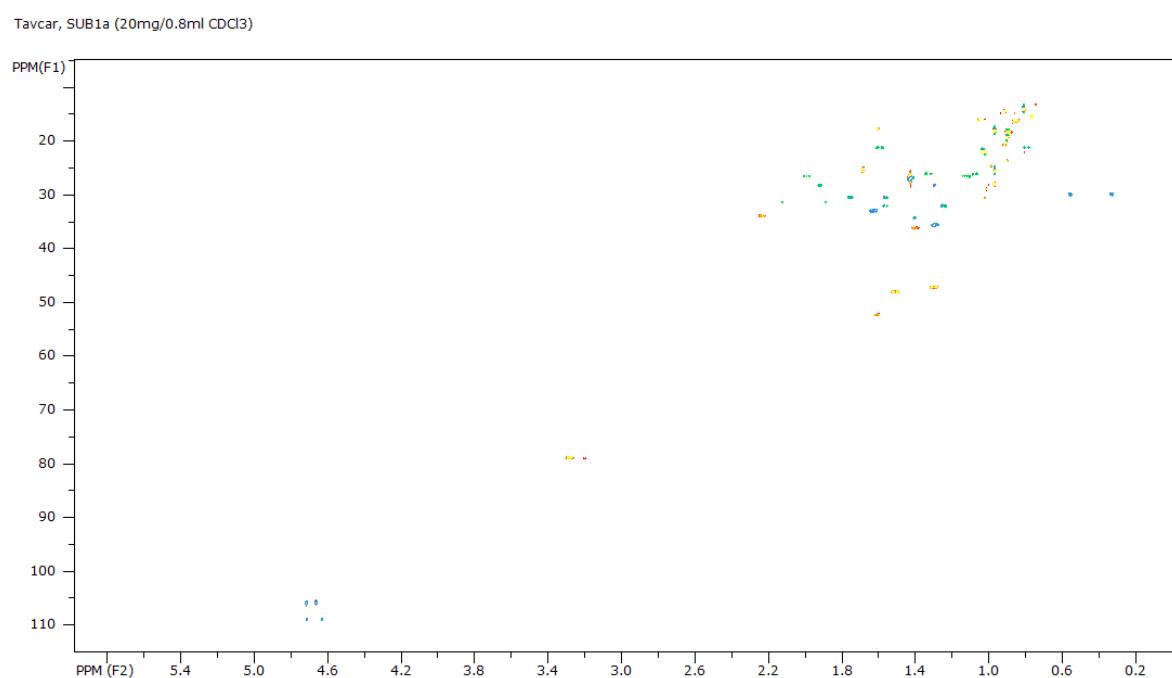


Slika 40. ^{13}C spekter spojine SUB1 v CDCl_3 posnet na aparatu AVA 600

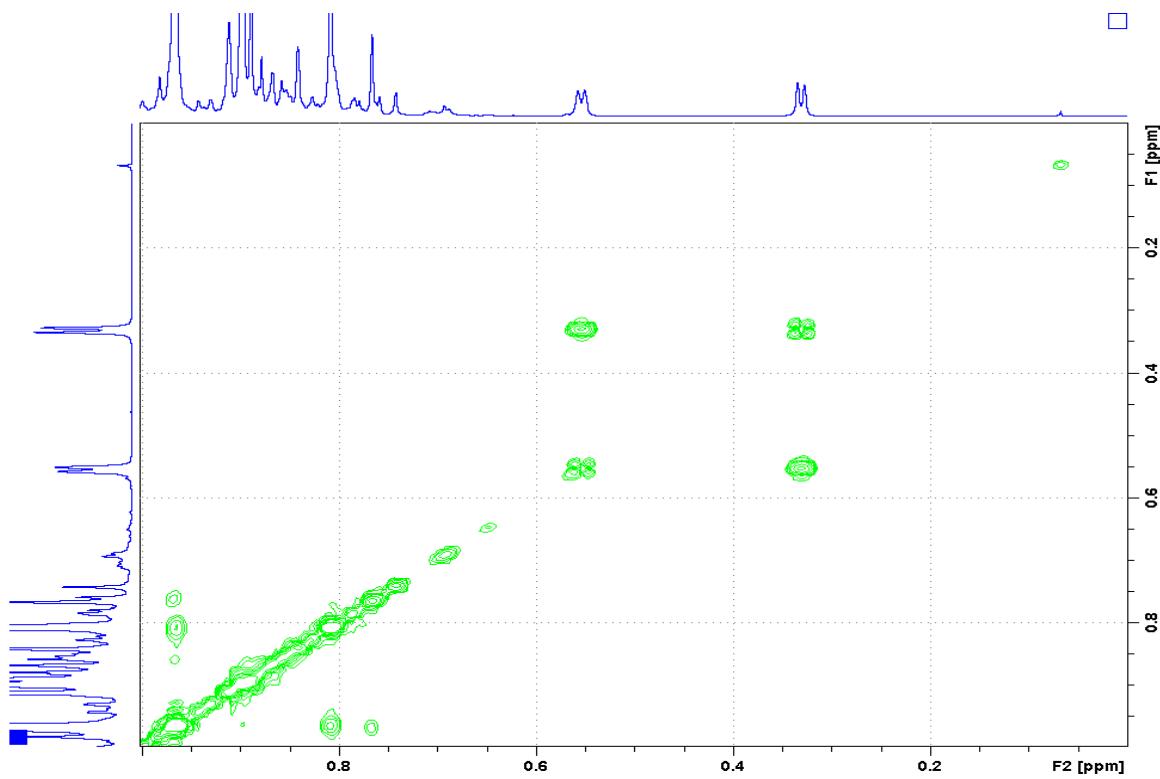
Signal pri 78,83 ppm nam kaže prisotnost hidroksilne skupine. Signal pri 29,89 ppm se na HSQC spektru (slika 42) sklaplja z dvema dubletoma protonskega spektra (slika 41) pri 0,55 in 0,33 ppm z enakima sklopitvenima konstantama 4,27 Hz. Predstavljata dva protona na C-19. To kaže na prisotnost ciklopropanskega obroča, ki je značilen za tetraciclične triterpene cikloartenolnega tipa. Singleti okrog 1 ppm potrdijo prisotnost terciarnih metilnih skupin. Prisotnost metilenske skupine na mestu 24 kažeta vrhova pri 4,71 in 4,66 ppm. Kemijska premika ogljikovih atomov sta 105,91 in 156,91 ppm, kar je značilno velik premik za metilensko skupino. Na C-25 sta simetrično vezani dve metilni skupini, ki v protonskem spektru tvorita značilen septet.



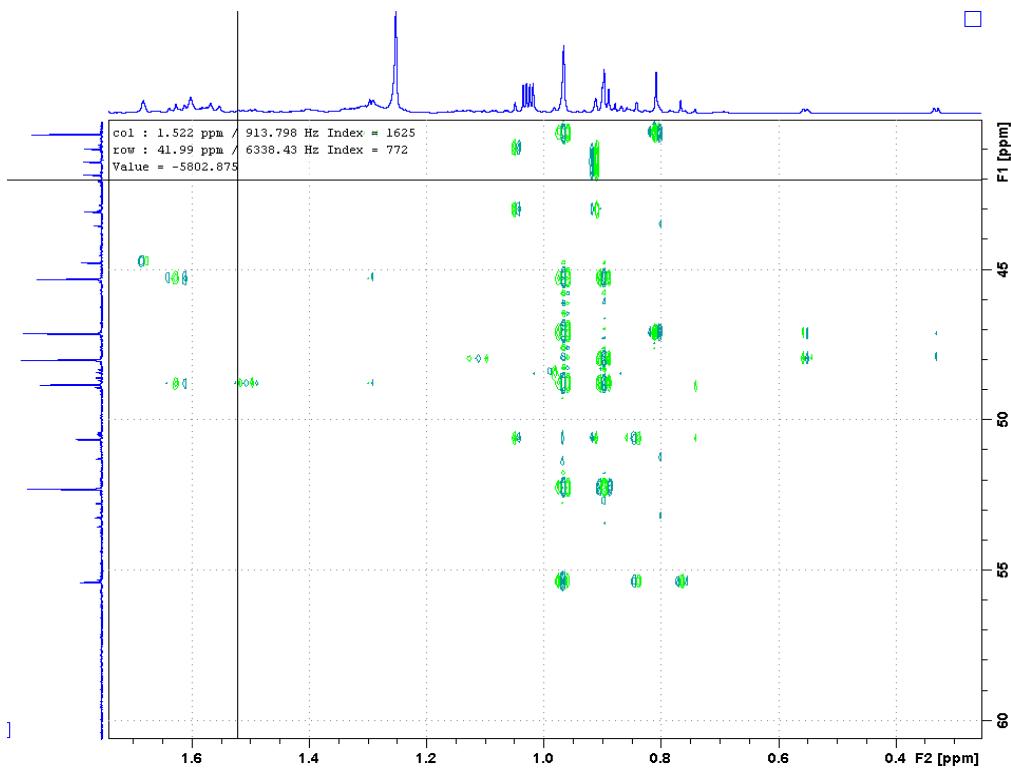
Slika 41. ¹H spekter spojine SUB1 v CDCl₃ posnet na aparatu AVA 600



Slika 42. HSQC spekter spojine SUB1 v CDCl₃ posnet na aparatu AVA 600



Slika 43. COSY spekter spojine SUB1 v CDCl_3 posnet na aparatu AVA 600



Slika 44. HMBC spekter spojine SUB1 v CDCl_3 posnet na aparatu AVA 600

Nekaj značilnih vrhov v masnem spektru:

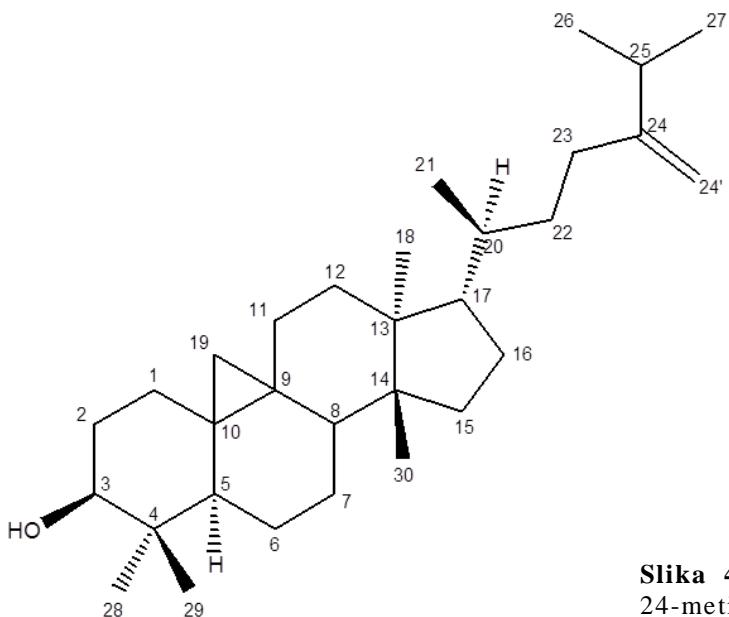
EI-MS m/z : 440.4 [M^+], 425.4, 422.4, 407.3, 379.3, 353.3

Molska masa spojine: $M = 440$ g/mol

Molekulska formula: $C_{31}H_{52}O$

Spojina SUB1 je bel amorfen prah.

Določili smo strukturo 24-metilencikloartanola (24-metilen-9,19-ciklolanostan-3-ol (3β)) (slika 46), ki v zmesi SUB1 prevladuje.



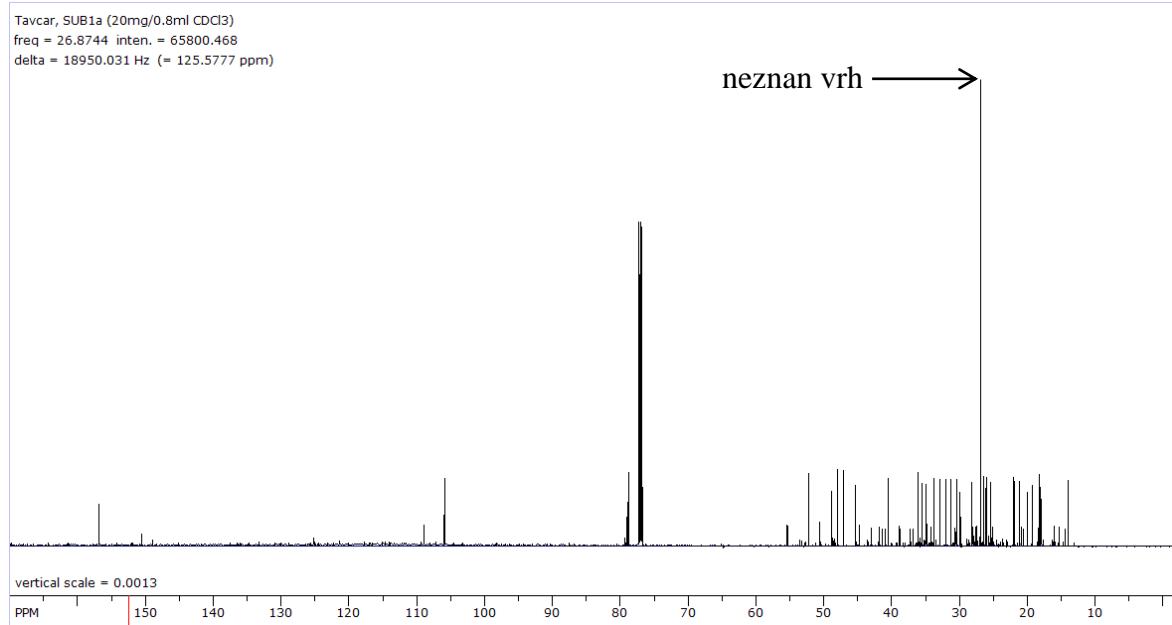
Slika 45. Struktura spojine SUB1,
24-metilencikloartanol

Preglednica IX. ^{13}C (150.92 MHz) in ^1H (600.13 MHz) 20 mg spojine SUB1 v CDCl_3

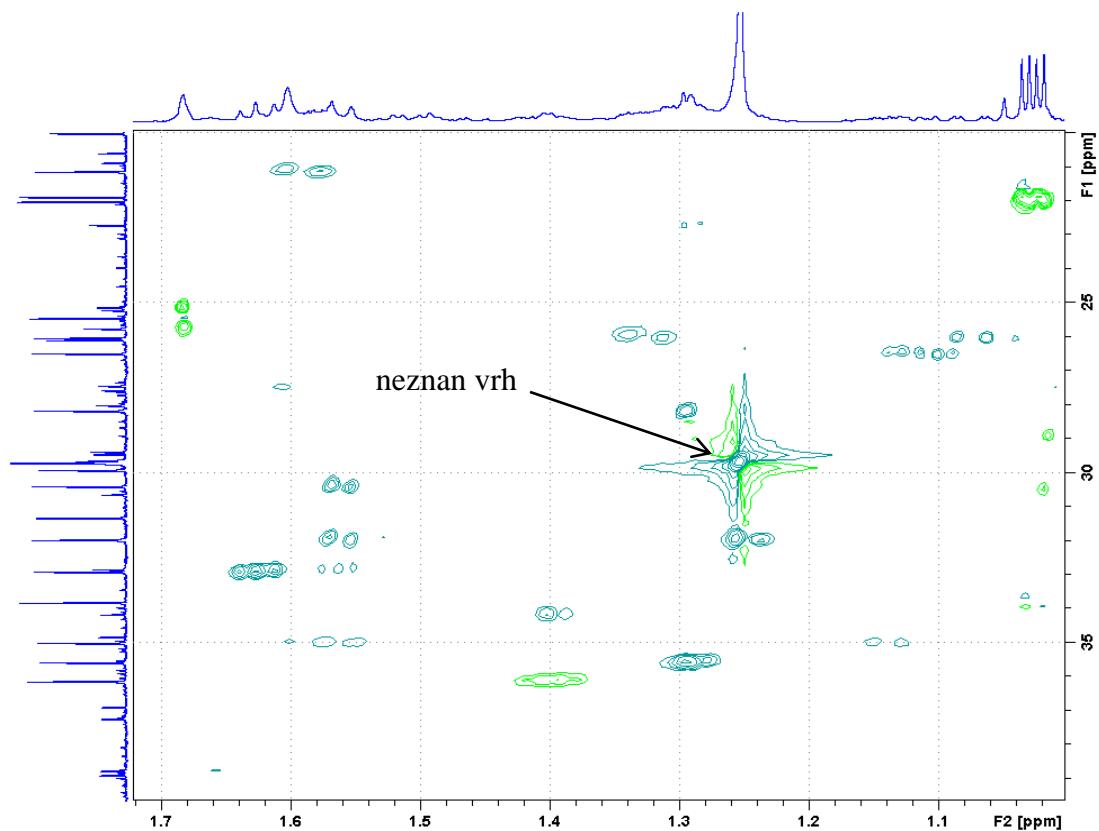
Atom	DEPT	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)		
1	CH_2	31,9524	1,2567	1,56	t
2	CH_2	30,3714	1,5599	1,7550	m
3	CH	78,8263	3,2828	3,1903	dd
4	C	40,4696	/		
5	CH	47,0942	1,30	1,51	dd
6	CH_2	21,1088	1,59	0,79	m^*
7	CH_2	26,059	1,33	1,07	m^*
8	CH	47,9774	1,5109		m
9	C	19,9806	/		
10	C	26,0018	/		
11	CH_2	26,4612	1,11	1,99	*
12	CH_2	32,8868	1,62		(2H)
13	C	45,2867	/		
14	C	48,7947	/		
15	CH_2	35,5545	1,29633		*
16	CH_2	28,1422	1,29631	1,92	*
17	CH	52,2558	1,60		
18	CH_3	18,2935	0,89		s*
19	CH_2	29,8864	0,5545 $J = 4,27 \text{ Hz}$	0,3312 $J = 4,27 \text{ Hz}$	dd
20	CH	36,1062	1,40		*
21	CH_3	19,311	0,89716		d*
22	CH_2	34,9763	1,57	1,14	*
23	CH_2	31,3013	1,88	2,12	*
24	C	156,9087	/		
25	CH	33,7963	2,23		septet
26	CH_3	21,9874	1,02		d*
27	CH_3	21,8578	1,03		d*
28	CH_3	25,4231	0,9653		s*
29	CH_3	13,99	0,80333		s
30	CH_3	18,0202	0,9657		s*
24'	CH_2	105,9117	4,7138	4,6613	s

*signal nejasen zaradi prekrivanja

V ^{13}C spektru (slika 47) še posebej izstopa intenzivnejši signal pri 26,9 ppm, ki se v HSQC sklaplja s protonom pri 1,43 ppm (slika 48). Čemu signala pripadata, nismo uspeli ugotoviti.



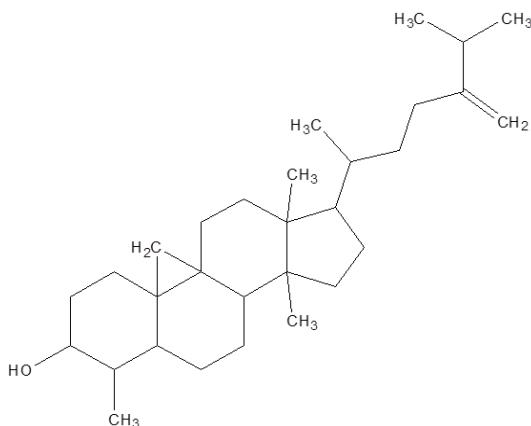
Slika 46. ^{13}C spekter spojine SUB1 v CDCl_3 posnet na aparatu AVA 600, neznan vrh



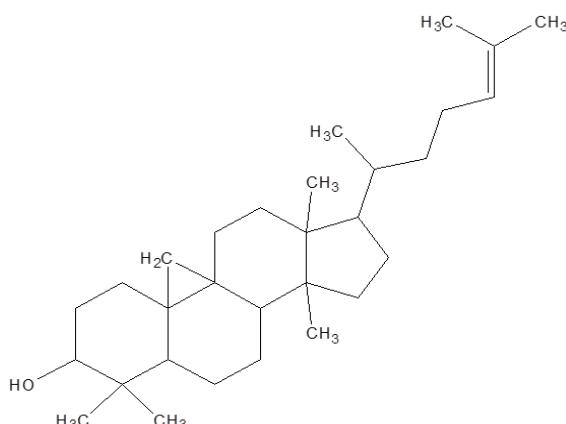
Slika 47. HSQC spekter spojine SUB1 v CDCl_3 posnet na aparatu AVA 600, neznan vrh

Na masnem spektru je razbrati odcep acetatne skupine (signala pri 468.4 in 408.4 g/mol), ki je naša molekula ne vsebuje. Sklepamo lahko, da je ena od nečistot v vzorcu lahko acetat SUB1. V ^{13}C spektru je opaziti tudi druge signale nižje intenzitete od signalov SUB1. Spektra sta podobna, torej je prisotna spojina sorodne strukture. To pojasni dejstvo, da ju nismo uspeli ločiti na silikagelu. Molekuli se po polarnosti verjetno skoraj ne razlikujeta, zato smo si pomagali z masnim spektrom. Molska masa ene od komponent v zmesi je 426.3 g/mol, kar bi ustrezalo cikloartenolu. Lee s sod. navaja, da je 24-metilencikloartenol zaradi strukturne podobnosti težko ločiti od cikloartenola. Njuni polarnosti sta preveč podobni za ločevanje s tankoplastno ali kolonsko kromatografijo, zato ju je potrebno pretvoriti v manj podobni spojini. Razlikujeta se po tem, da cikloartenol vsebuje trisubstituirano dvojno vez, medtem ko 24-metilencikloartenol vsebuje zunanjou eksometilensko skupino. Zmes so zato podvrgli hidroboraciji (diboran/THF, H_2O_2 , NaOH). Iz cikloartenola je nastal sekundarni, iz 24-metilencikloartenola pa primarni alkohol. Razlika v polarnosti je bila tako dovolj velika za uspešno ločbo (38).

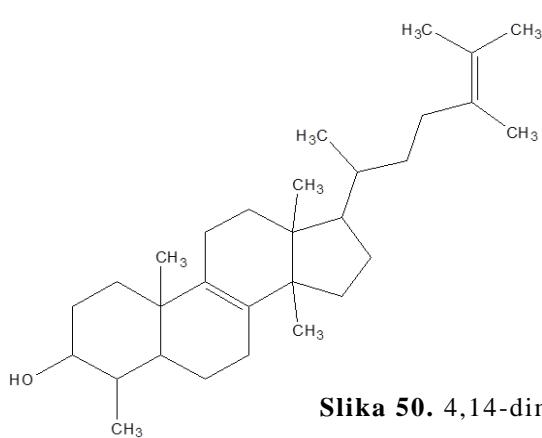
Nekaj primerov spojin, ki bi se poleg SUB1 lahko nahajale v zmesi:



Slika 48. Cikloleukalenol: 4,14-dimetil-9,19-cikloergost-24(28)-en-3-ol ($3\beta,4\alpha,5\alpha$)



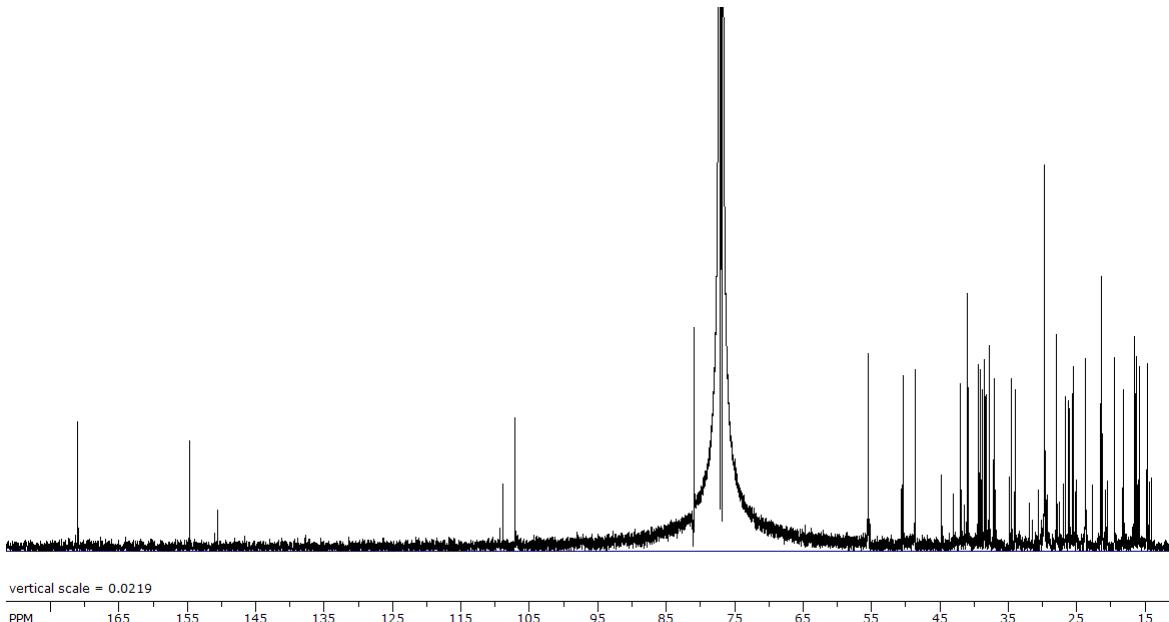
Slika 49. Ciklololanstan: 9,19-ciklololanost-24-en-3-ol (3β)



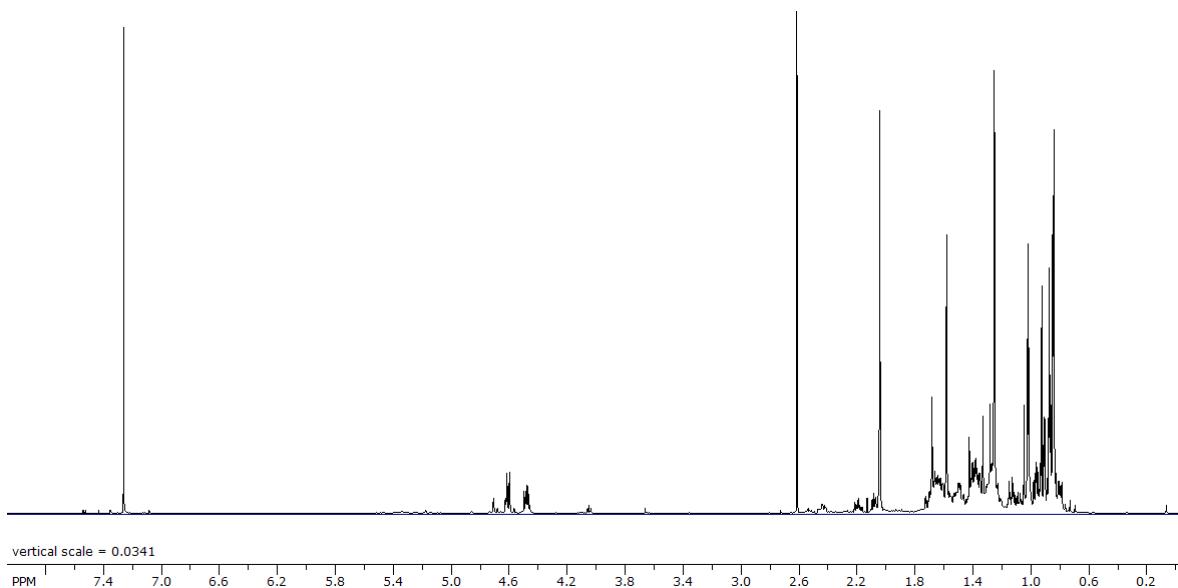
Slika 50. 4,14-dimetil-5-ergosta-8,24-dien-3-ol

4.2.2. Struktura SUB2

Strukturo SUB2 smo določili s primerjavo NMR spektrov s SUB1 in z opisi podobnih spektrov iz literature (38, 40, 41, 42). Zaradi nečistega vzorca se je v ogljikovem (slika 52), še bolj pa v protonskem (slika 53) in HSQC spektru (slika 54) pojavilo mnogo vrhov, za katere nismo prepričani, če spadajo k SUB2 ali k primesi. Iz tega razloga nismo določili vseh ogljikovih atomov, ampak le posamezne funkcionalne skupine. Podobno kot pri SUB1 je hidroksilna skupina vezana na C-3, ki daje signal pri 80,97 ppm. Na protonskem spektru je opaziti dubleta pri 0,34 in 0,57 ppm, predstavnika protonov na ciklopropanskem obroču. Signala sta zelo šibka, zato ne moremo z gotovostjo trditi, da naša spojina vsebuje ciklopropanski obroč. Prisotnost metilnih skupin kažejo singleti okrog premika 1 ppm. Metilensko skupino C24 in C24' izražata vrhova pri 4,61 in 4,59 ppm. Na acetatno skupino, vezano na mestu C-3 kaže signal pri 2,04 ppm. Prisotnost acetata potrdi masni spekter. Odcep acetatne skupine pri razpadanju molekule kažeta masi pri 468,4 in 408,4 g/mol.

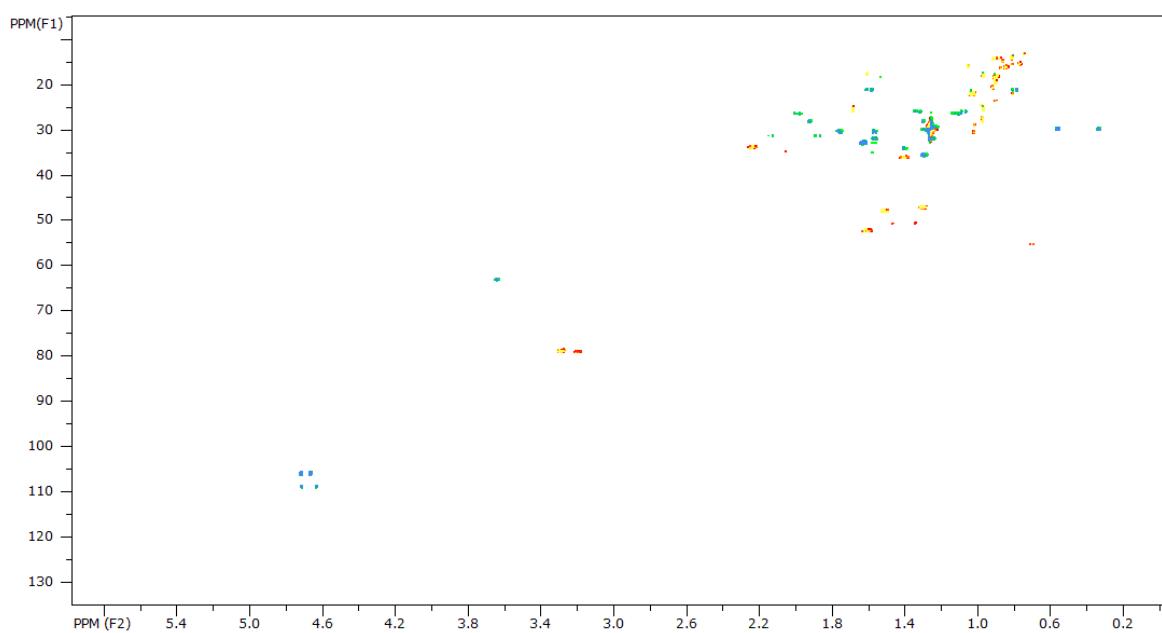


Slika 51. ¹³C spekter spojine SUB2 v CDCl₃ posnet na aparatu AVA 600



Slika 52. ¹H spekter spojine SUB2 v CDCl₃ posnet na aparatu AVA 600

Tavcar, SUB2 (7mg/0.8ml CDCl₃)



Slika 53. HSQC spekter spojine SUB2 v CDCl₃ posnet na aparatu AVA 600

Nekaj značilnih vrhov v masnem spektru:

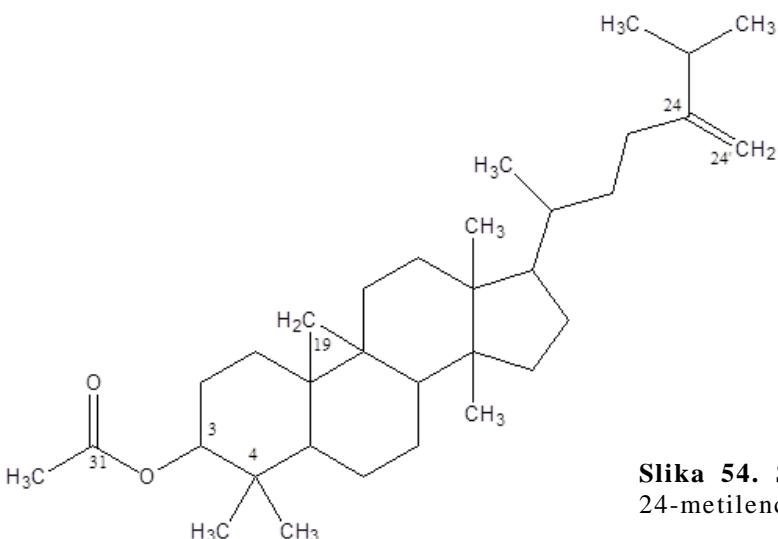
EI-MS m/z : 468.4 [M^+], 453.3, 408.4, 357.3, 249.2, 218.2, 189.2

Molska masa spojine: $M = 468$ g/mol

Molekulska formula: $C_{33}H_{52}O$

Spojina SUB2 je bel amorfen prah.

Določili smo strukturo 24-metilencikloartanolacetata (24-metilen-9,19-ciklolanostan-3-acetat) (slika 55).



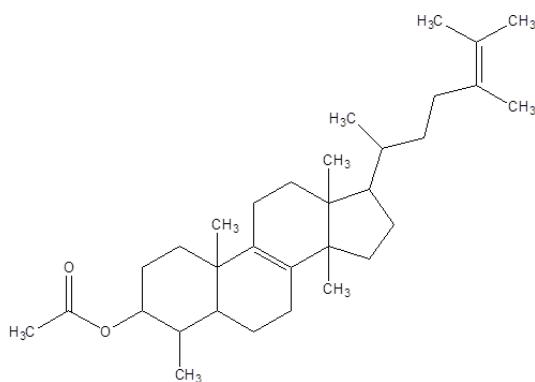
Slika 54. Struktura spojine SUB2,
24-metilencikloartanolacetat

Preglednica X. ^{13}C (150.92 MHz) in 1H (600.13 MHz) 7 mg spojine SUB2 v $CDCl_3$

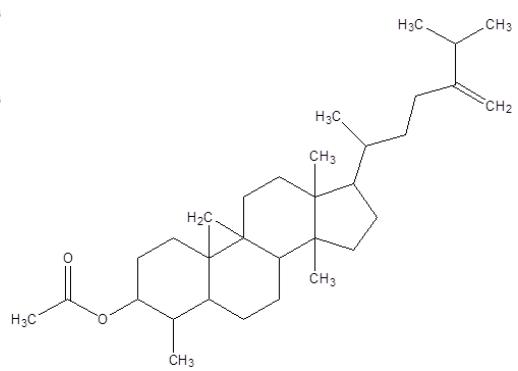
Atom	DEPT	δC (ppm)	δH (ppm)		
31	C	171,02	/		
24	C	154,65	/		
24'	CH_2	107,10	4,61	4,60	m
3	CH	80,97	4,49	4,47	dd
19	CH_2	29,68	0,34 $J = 4,0$ Hz	0,57 $J = 4,0$ Hz	dd
4	C	41,00	/		

Poleg SUB2 se nesporno pojavljajo primesi podobne strukture. Kot v primeru SUB1 gre tudi tu med drugim verjetno za demetilirano različico prevladujoče komponente, to je cikloartenil acetat. S podobno situacijo oteženega ločevanja spojin so se soočili Makino T in sod. V članku opisujejo ločitev zmesi 24-metilencikloartanil acetata in cikloartenilacetata (slika 38). Navajajo, da je zmes spojin na TLC plošči tvorila le eno liso. Zmesi v diklorometanu so zato dodali m-klorbenzojsko kislino (6 h, 40°C), da se je cikloartenilacetat pretvoril v epoksid. Epoksid so od 24-metilencikloartanil acetata ločili s kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze 40 % etilacetata v heksanu (43).

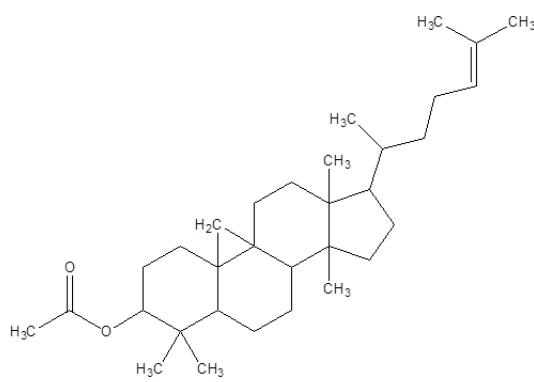
Nekaj primerov spojin z molsko maso 468 g/mol, ki bi se poleg SUB2 lahko nahajale v zmesi (slike 56, 57 in 58).



Slika 55. 4,14-dimetil-5-ergosta-8,24-dien-3-acetat



Slika 56. Cikloleukalenol acetat:
4,14-dimetil-9,19-cikloergost-24(28)-en-3-acetat ($3\beta,4\alpha,5\alpha$)



Slika 57. Ciklolosten acetat: 9,19-ciklolosten-24-en-3-acetat (3β)

5. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo iz diklorometanskega ekstrakta vrste *E. acanthothamnos* uspešno izolirali sterolom podobne spojine.

Kot ustrezen orositveni reagent za detekcijo komponent v ekstraktu se je izkazal anisaldehid, topila za mobilne faze pa diklorometan, cikloheksan in metanol. V začetnih stopnjah izolacije smo se soočili z zamašitvijo VLC kolone, povezano z naravo komponent v vzorcu. Za izboljšanje teh stopenj predlagamo odstranitev polarnejših komponent s predhodnim porazdeljevanjem diklorometanskega ekstrakta med n-butanol in cikloheksan. Pri nadaljnjih metodah normalnofazne kolonske kromatografije smo vzorce uspešno in ponovljivo ločevali na frakcije ter pri tem dosegali zadovoljive izkoristke. Kljub temu spojin nismo popolnoma očistili niti z uporabo metod tekočinske kromatografije visoke ločljivosti in gelske kromatografije.

Z uporabo NMR spektroskopije in masne spektrometrije smo vseeno določili strukturo glavnih komponent v končnih eluatih. Določili smo strukturi prekurzorja fitosterolov 24-metilencikloartanola ter njegovega derivata 24-metilencikloartanol acetata. Prvi je triterpenoidne strukture in v rastlini igra vlogo biosintetskega prekurzorja sterolov. Kot del prehranskih dopolnil zmanjšuje plazemske koncentracije holesterola in tako sodeluje pri preprečevanju ateroskleroze. Dolgoročno učinkuje proti hiperglikemiji ter dokazano znižuje nivo hemoglobina A1c brez povzročitve akutne hipoglikemije. Sklepamo, da se v *E. acanthothamnos* nahaja v večjih količinah, saj je v našem primeru predstavljal 3,9 % masnega deleža diklorometanskega ekstrakta. Njegovo izolacijo bi v nadaljnje lahko optimirali in nadaljevali z raziskavami farmakoterapevtske uporabnosti. 24-Metilencikloartanol acetat je njegov na mestu C-3 zaestren derivat z neznano vlogo. Na podlagi NMR in masnih spektrov smo potrdili domnevo, da od obeh spojin nismo uspeli odstraniti nečistot zaradi velike podobnosti struktur v vzorcih. Za izolacijo popolnoma čistih spojin bi se morali poslužiti drugačnih metod separacije. Te vključujejo kemijske pretvorbe spojin z nadaljnjo kolonsko kromatografijo, opisane v poglavju 4.2.1. Struktura SUB1. Metod izolacije nismo optimirali zaradi premajhne količine izhodnega rastlinskega materiala. Zaradi nečistih produktov nismo izvedli merjenja tališča, optične sučnosti in toksikološkega MTT testa.

Med raziskovanjem smo z metodami tankoplastne kromatografije detektirali mnoge komponente, ki bi bile primerne za nadaljnjo izolacijo. Optimirali smo tudi mobilno fazo

DCM/MeOH/H₂O (70/30/3), s katero bi začeli z elucijo metanolnega ekstrakta.

Z rezultati našega raziskovalnega dela smo uspešno prispevali k že znanemu spektru spojin v vrsti *Euphorbia acanthothamnos* L.

LITERATURA

1. Frohne D: Giftpflanzen: ein Hanbuch für Apotheker, Ärzte, Toxikologen und Biologen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, 1997; 181-182.
2. Wikipedia – *Euphorbiaceae*: <http://en.wikipedia.org/wiki/Euphorbiaceae>, dostopano 6.6.2010
3. © PBI Euphorbia Project: http://www.euphorbiaceae.org/pages/about_euphorbia.html, dostopano 6.6.2010
4. Frajman B, Jogan N: Mlečki (rod Euphorbia) Slovenije. Scopolia 2007; 62: 1-68.
5. Hohmann J, Evanics F, Dombi G, Molnár J, Szabó P: Euphosalicin, a new diterpene polyester with multidrug resistance reversing activity from *Euphorbia salicifolia*. Tetrahedron 2001; 57: 211-215.
6. Hohmann J, Rédei D, Evanics F, Kálmán A, Argayc G, Bartók T: Serrulatin A and B, New Diterpene Polyesters from *Euphorbia serrulata*. Tetrahedron 2000; 56: 3619-3623.
7. Shi Q W, Su X H, Kiyota H: Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphorbia*. Chem. Rev. 2008; 108: 4295–4327.
8. Valente C, Pedro M, Asceno J R, Abreu P M, Nascimento M S J, Reffeira M J U: Euphopubescenol and Euphopubescen, Two New Jatrophane Poliesters, and Lathyrane-type Diterpenes from *Euphorbia pubescens*. Planta Med. 2004; 70: 244-246.
9. Marco J A, Sanz-Cervera J F, Yustet T A, Jakupovic J: Terracinolides from *Euphorbia Terracina*. Phytochemistry 1997; 45: 137-140.
10. Liu LG, Tan RX: New Jatrophane Diterpenoid Esters from *Euphorbia turczaninowii*. J. Nat. Prod. 2001; 64 (8): 1064-1068.
11. Petauer T: Leksikon rastlinskih bogastev, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1993, 205-206.
12. Adedapo1 A A, Abatan M O, Olorunsogo O O: Toxic effects of some plants in the genus *Euphorbia* on haematological and biochemical parameters of rats. Veterinarski arhiv; 74 (1): 53-62.
13. Martinčič A, Sušnik F: Strupene rastline, Cankarjeva Založba, 1961, Ljubljana, strani 168-169.

14. Betancur-Galvis L A , Morales G E, Forero J E, Roldan J: Cytotoxic and Antiviral Activities of Colombian Medicinal Plant Extracts of the *Euphorbia* genus. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2002; 97(4): 541-546.
15. Ogueke C C, Ogbulie J N, Okoli I C, Anyanwu B N: Antibacterial Activities And Toxicological Potentials Of Crude Ethanolic Extracts OF *Euphorbia hirta*. Journal of American Science 2007; 3.
16. Corea G: Jatrophane diterpenes from *Euphorbia* spp. as modulators of multidrug resistance in cancer therapy, Phytochemistry Reviews 2009; 431-447. (abstract)
17. Visit West Crete: http://www.west-crete.com/flowers/euphorbia_acanthothamnos.htm, dostopano 6.6.2010
18. Tsiorliris G M, Tsekoura Z, Kasapidis P, Chatzaki M, Maroukli M: Preliminary results on the woody plants composition of Cretan phygranic ecosystems. Progress in botanical research 1998; 170.
19. Kazakis G, Ghosn D, Vogiatzakis I N, Papanastasis V P: Vascular plant diversity and climate change in the alpine zone of the Lefka Ori, Crete. Biodivers. Conserv. 2006.
20. Holly E: A Scamper Through the Years, The Reading Naturalist. Reading and District Natural History Society 1989; 41:5.
21. Lohmueller F A: The Botanical System of the Plants:
http://www.f-lohmueller.de/botany/apg/apg_ii.htm#Rosales, dostopano 6.6.2010
22. Myrianthopoulos V, Fokialakis N, Magiatis P , Aligiannis N, Tekwani B, Skaltsounis A L: Constituents of *Euphorbia acanthothamnos* and evaluation of their antileishmanial activity. Planta Medica 2008; 74: PB 174. (abstract)
23. Barla A, Öztürk M, Kültür Ş And Öksüz S: Screening of antioxidant activity of three *Euphorbia* species from Turkey. Fitoterapia 2007; 78, 423-425.
24. Rojas R S V, Somoza B, Ortega T, Villar A M, Tejerina T: Vasodilatory effect in rat aorta of eriodictyol obtained from *Satureja obovata*. Planta Med. 1999; 65(3): 234-8.
25. Nöthlings U, Murphy S P, Wilkens L R, Henderson B E, Kolone L N. Flavonols and Pancreatic Cancer Risk. American Journal of Epidemiology 2007; 166(8): 924–93.

26. Li J, Guo W J, Yang Q Y: Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World J Gastroenterol* 2002; 8(3): 493-495.
27. Lichtner M, Mengoni F, Battinelli L, Mazzanti G, Braca A, Mastroianni C M, Vullo V: Anti-HIV Activity of Oleanolic Acid on Infected Human Mononuclear Cells. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999; 39: 318 (abstract no. 933).
28. Dutta P C: Phytosterols as functional food components and nutraceuticals. *Marcel Dekker* 2004.
29. Chapman, Hall: Dictionary of Natural Products on CD-ROM. *Chapman & Hall/CRC* 2002: 121-130.
30. Miller A: Analytik von Minorlipiden: Ferulasäureester von Phytosterolen (γ -Oryzanol) in Reis. Doktorska dizertacija. Technische Universität München, 2004.
31. Grunwald C, Saunders P F: The Biochemical Functions of Terpenoids in Plants, Function of Sterols [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 1978; 284 (1002): 541-558.
32. The AOCS Lipid Library: http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/plant_st/index.htm, dostopano 10.6.2010
33. Sakamoto K, Tabata T, Shirasaki K, Inagaki T, Nakayama S: Effects of r-Oryzanol and Cycloartenol Ferulic Acid Ester on Cholesterol Diet Induced Hyperlipidemia in Rats. *Japan J. Pharmacol.* 1987; 45, 559-565.
34. Patel M, Naik S N: Gamma Oryzanol from rice bran oil – A review. *Journal of Scientific and Industrial Research* 2004; 63: 569-578.
35. Inganaki T, Aoki H, Aikawa H, Takahashi M: Cycloartenol ferulate/cyclodextrin complex. United States Patent, Patent number 4,707,472, date of patent Nov. 17, 1987.
36. FreshPatents - Drug and food or drink for improving hyperglycemia patent description: <http://www.freshpatents.com/Drug-and-food-or-drink-for-improving-hyperglycemia-dt20070823ptan20070196435.php?type=description>, dostopano 6.6.2010
37. Kpoviessi S S D, Accrombessi G C, Gbénou J D, Gdaguidi F A, Kossou D K, Moudachirou M, Quetin-Leclercq J: Cytotoxic Activities of Sterols and Triterpens Identified by GC-MS in *Justicia anselliana* (NEES) T. Anders Active Fractions and

- Allelopathic Effects on Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) plant. J. Soc. Quest-Afr. Chim. 2008; 26: 59-67.
38. Hostettmann K, Marston A: Chemistry and pharmacology of Natural products - Saponins. Cambridge University Press 1995: 123-127.
39. Lee S S, Young L H, Wang C C: Separation of 24-Methylenecycloartanol from Cycloartenol via Chemical Method. Journal of Natural Products 1992; 55 (5): 644-648.
40. Makino T, Murae T, Tsuyuki T, Takahashii T: Synthesis of a 24-Epimeric Mixture of a 24-Methyl-19,29-dinorlanost-9(11)-en-3-one. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1989; 62: 4075-4077.
41. Oku H, Baba S, Koga H, Takara K, Iwasaki H: Lipid composition of mangrove and its relevance to salt tolerance. J Plant Res 2003; 116:37-45.
42. Paula V F, Barbosab L C A , Erringtonc W, Howarthc O W, Cruza M P J: Chemical Constituents from *Bombacopsis glabra* (Pasq.) A. Robyns: Complete 1H and 13C NMR Assignments and X Ray Structure of 5-Hydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone. Braz. Chem. Soc. 2002; 13 (2): 276-280.
43. Amadou S B, Guo D A, Norton R A, Phillips S A Jr., Nes D W: Developmental Differences in the Sterol Composition of SoJenopsis invicta. Department of Plant and Soil Archives of Insect Biochemistry and Physiology 1995; 29: 1-9.