

ZBORNÍK PRÍSPEVKOV
3. KONFERENCIE
CENTRA EXCELENTNOSTI

**Aplikácia OMICS nástrojov v štúdiu vzniku chorôb a ich
prevencie**



Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, Bratislava

30. november 2022

Recenzent

RNDr. Jana Bellová, PhD.

chemjbel@savba.sk

Editor

Mgr. Mária Šedivá, PhD.

chemsedm@savba.sk

Ing. Mária Kopáčová

chemmari@savba.sk

ISBN 978 – 80 – 971665 – 4 - 0

Identifikácia inozitolov v rastline *Stellaria media* hmotnostnou spektrometriou

Mária Kopáčová^{1,2}, Vladimír Pätoprstý¹

¹Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika

²Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika

Úvod

Inozitoly sú najrozšírenejšie cyklitololy v eukaryotických bunkách, s empirickým vzorcom C₆H₁₂O₆ (1,2,3,4,5,6-cyklohexanol). Tieto chemické zlúčeniny existujú v deviatich možných stereoizoméroch. Päť z nich, myo-, scyllo-, muco-, neo- a D-chiro-inozitol sa vyskytujú v prírode, kým ostatné štyri možné izoméry (L-chiro-, allo-, epi- a cis-inozitol) sú odvodené z myo-inozitolu [1]. Medzi všetkými známymi inozitolmi sa v prírode najviac vyskytuje myo-inozitol. Je vo všetkých eukaryotických bunkách, kde tvorí štruktúrny základ pre množstvo sekundárnych látok. Je tiež dôležitou zložkou stavebných lipidov (fosfatidylinozitol) PI a ich rôznych fosfátov, fosfatidylinozitol fosfátových lipidov PIP. Niektoré inozitoly sú bežne v prírode ako čisté látky alebo ako ich deriváty [2].

Niektoré z metyléter derivátov inozitolu sú rastlinné sekundárne metabolity, zlúčeniny, ktoré sa priamo nezúčastňujú normálneho rastu, ale hrajú dôležitú úlohu v obrane proti nepriaznivým podmienkam prostredia. Medzi nimi rozlišujeme 5-O-metyl-myo-inozitol (*sequoyitol*), 1-O-metyl-myo-inozitol (*bornesitol*), 4-O-metyl-myo-inozitol (*ononitol*), 5-O-metyl-allo-inozitol (*brahol*), di-O-metyl-(+)-chiro-inozitol (*pinpollitol*) a 1L-2-O-metyl-chiro-inozitol (*L-quebrachitol*). 3-O-metyl-D-chiro-inozitol (*D-pinitol*) je najrozšírenejší inozitol éter v rastlinách [3].

Protizápalové vlastnosti cyklitolov pomáhajú redukovať rozvoj metabolických porúch (cukrovka, hypertenzia) a aterosklerózy. Známe sú aj inzulín-napodobujúce účinky D-pinitolu, D-chiro-inozitolu a sequoyitolu. Myo-inozitol spolu s D-chiro-inozitolom dokáže zlepšiť vývoj kostí a minerálnu hustotu kostí, čím potláčajú osteoklastogénu. Myo-inozitol a ostatné cyklitololy majú tiež antioxidantné, protizápalové a protirakovinové vlastnosti [4].

Hviezdica prostredná (*Stellaria media*), pre niekoho známa ako chutná burina, využívaná na prípravu šalátov, smoothies, pomazánok, do polievok alebo ako čaj, je bohatá na mnohé prospešné fytochemikálie, ale nikde sa nespomínajú inozitoly. Preto bolo cieľom tejto práce identifikovať, či *Stellaria media* obsahuje inozitoly a ktoré konkrétne druhy.

Materiál a metódy

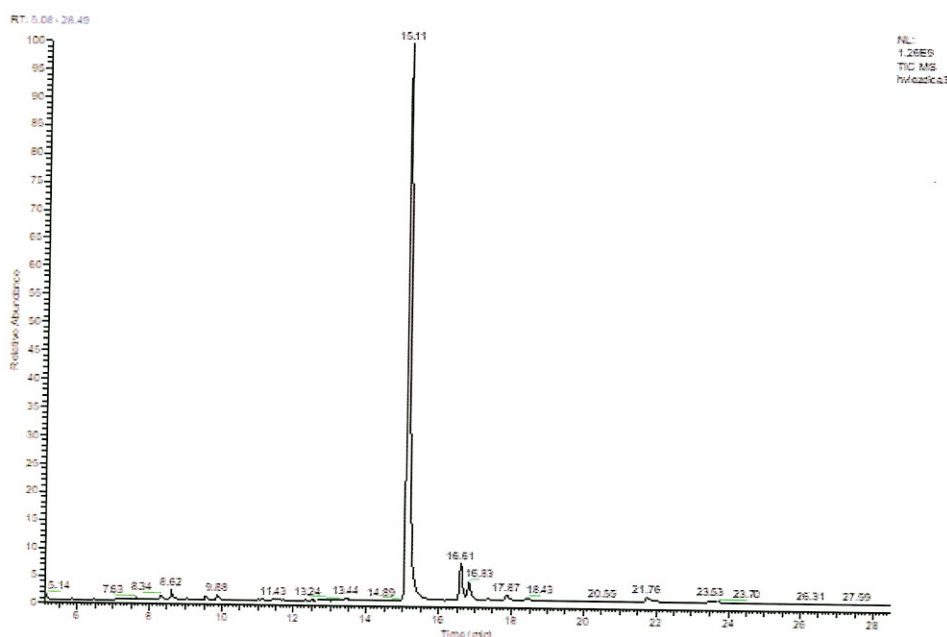
Listy hviezdice prostrednej (*Stellaria media*) boli lyofilizované, aby sa zachoval obsah látok v nich. Následne boli podvrvené a extrahované v metanole. Extrakt bol homogenizovaný 30 min pri laboratórnej teplote ultrazvukovým homogenizátorom s pulzom 10 s x 1 s (Bandelin

Sonopuls HD 3100) pre lepšiu výťažok. Po 5 min vortexovaní (IKA Vortex Genius 3) a 5 min centrifugácii (Heraeus PICO 17 Centrifuge) sa odobratý 1 ml nechal odpariť. Vzorka sa pred analýzou GC-MS derivatizovala zásaditou acetyláciou pridaním 50 μ l pyridínu a 50 μ l acetanhydridu v termobloku (Block heater SBH130D STUART) 1 hod pri 80°C. Po acetylácii sa nechala vzorka odpariť do sucha a rozpustila v ACN.

Vzorky boli analyzované plynovým chromatografom v spojení s hmotnostným detektorom GC-MS (Trace GC Ultra Thermo Scientific - TSQ Quantum XLS) s použitím kremennej kapilárnej kolóny SP-2330 (30m x 0.25mm x 0.2 μ m) a teplotným gradientom: 180 °C (4 min) – 20 °C/min – 230 °C – 2 °C/min – 250 °C (10 min). Tieto podmienky boli optimalizované a teplotný program dosahuje najlepšiu separáciu. Prietok hélia bol 0,6 ml/min, teplota iónového zdroja a dávkovača bola 200 °C a 240 °C. Použitá bola elektrónová ionizácia (70 eV) a kvadrupólový analyzátor operoval vo full scan móde v hmotnostnom rozsahu 40–450 m/z.

Výsledky a diskusia

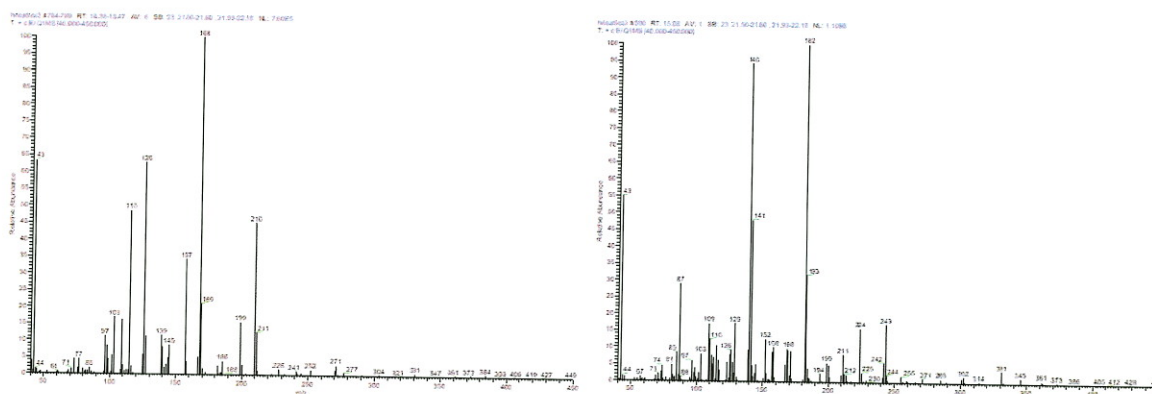
Separáciou extraktu *Stellarie media* plynovou chromatografiou sa získal chromatogram eluovaných inozitolov, ktoré boli potvrdené hmotnostnými spektrami a retenčnými časmi rovnako pripravených nameraných štandardov. V študovanej rastline bol identifikovaný 1 inozitol a 2 metyléter inozitoly, ktoré sa pravdepodobne nachádzajú v rastline vo voľnej forme.



Obr.1: GC-MS chromatogram eluovaných inozitolov, metyl-éter derivátov z extraktu listov *Stellarie media* na kolóne SP-2330, identifikovaných hmotnostným spektrometrom s trojitým kvadrupólom v elučnom poradí: D-pinitol (15,11 min), ononitol (17,87 min), myo-inozitol (18,43 min). V analyzovanom extrakte listov boli identifikované aj acetylované hexózy (16,61 min a 16,83 min).

Tab.1: Relatívne percentá [%] zastúpenia jednotlivých inozitolov v listoch *Stellarie media*

	RT [min]	Plocha [%]
D-pinitol	15,11	98,69
ononitol	17,87	0,99
myo-inozitol	18,43	0,33



Obr.2: MS spektrum acetylovaného inozitolu a metyléter inozitolu

Vo hviezdici prostrednej bol identifikovaný D-pinitol ako dominantný voči ďalším dvom inozitolom, ononitolu a myo-inozitolu. Možno skonštatovať, že okrem už známych fytochemikálií obsiahnutých v *Stellarii media* (saponíny, taníny, terpenoidy a i.) prispievajú k liečivým vlastnostiam tejto rastliny, používanej v kuchyni, aj inozitoly, najmä D-pinitol so svojimi inzulín-napodobujúcimi účinkami.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla s podporou Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Vývoj produktov modifikáciou prírodných látok a štúdium ich multimodálnych účinkov na COVID-19, ITMS: 313011ATT2, spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Táto práca bola podporená Slovenskou grantovou agentúrou VEGA (Grant č. 2/0096/20).

Literatúra

- [1] Al-Suod H., Ligor M., Raĕiu I.-A., et al. (2017) *Phytoch. Lett.* 20, p. 507
- [2] Sanz M. L., Martínez-Castro I., Moreno-Arribas M. V. (2008) *Food Chem.* 111, p. 778
- [3] Endringer D. C., Pezzuto J. M., Braga F. C. (2009) *Phytomed.* 16, p. 1064
- [4] Owczarczyk-Saczonek A., Lahuta L. B., Ligor M., et al. (2018) *Nutrien.* 10, p. 1891