

Identifikácia skupiny cyklitolov v kvetoch *Magnolia soulangeana* hmotnostnou spektrometriou

Mária Kopáčová^{1,2}, Vladimír Pätoprstý¹

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra analytickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika; kopacova8@uniba.sk

²Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Analytické oddelenie, Dúbravská cesta 9, 845 38, Bratislava, Slovenská republika

Abstract

Identification of a group of cyclitols in flowers of *Magnolia soulangeana* by mass spectrometry

Inositols, the most widespread cyclitols in eucaryotic cells with their methyl ether derivatives as plant secondary metabolites have numerous pharmaceutical properties and are widely distributed in the plants. This work deals with the identification of inositols in the flowers of *Magnolia soulangeana* by mass spectrometry. Gas chromatography was used to separate inositols on polar column SP-2330 after derivatization. In the flowers of *Magnolia soulangeana* 2 methyl ether inositols and 2 inositols have been identified with their relative percentages of the peak area: D-pinitol (84,33 %), chiro-inozitol (0,71 %), ononitol (2,73 %), myo-inozitol (12,22 %). The diverse content of inositols makes the most commonly cultivated species *Magnolia soulangeana* an exceptional species with potential healing effects, as well as the most well-known *Magnolia officinalis*, known for its bioactive neolignans.

Keywords: inositols; *Magnolia soulangeana*; GC; mass spectrometry; identification

Úvod a formulácia cieľa

Najrozšírenejšie cyklitoly v eukaryotických bunkách sú inozitoly, ktoré majú 6-uhlíkatú cyklickú štruktúru so 6 hydroxylovými skupinami. Inozitoly existujú v 9 možných stereoizoméroch. V prírode sa vyskytuje päť z nich, myo-, scyllo-, mucu, neo- a D-chiro-inozitol, kým ostatné štyri možné izoméry sú odvodené z myo-inozitolu (L-chiro-, allo-, epi- a cis-inozitol). Hmotnostná spektrometria je najčastejšie používanou metódou pri detekcii cyklitolov, pretože ponúka vysokú citlivosť, selektivitu a univerzálnosť. Cyklitoly sa pred GC separáciou upravujú na prchavejšie deriváty, zvyčajne trimetylsilyláciou. GC-MS metóda bola použitá napr. pri identifikácii cyklitolov v mrkve, čerstvých ovocných šťavách, mede [1].

V prírode sa najviac vyskytuje myo-inozitol. Ako súčasť eukaryotických buniek tvorí štruktúrny základ pre množstvo sekundárnych látok a je dôležitou zložkou stavebných lipidov (fosfatidylinozitol) PI a ich rôznych fosfátov, fosfatidylinozitol fosfátových lipidov PIP. Inozitoly sa vyskytujú v prírode ako čisté zlúčeniny alebo ako ich deriváty [2].

Metyléter deriváty inozitolu ako rastlinné sekundárne metabolity sa priamo nezúčastňujú normálneho rastu, ale majú významnú úlohu v obrane proti nepriaznivým podmienkam prostredia. Medzi nimi rozlišujeme 5-O-metyl-myo-inozitol (*sekvojitol*), 1-O-metyl-myo-inozitol (*bornezitol*), 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].

Inozitoly sa podieľajú na prenose niekoľkých endokrinných signálov, vrátane inzulínu, hormónov štítnej žľazy, gonadotropínov, lipidov s aktivitou podobnou hormónom (ako prostaglandíny) a mnohých ďalších endokrinných systémov [4]. Protizápalové vlastnosti cyklitolov pomáhajú redukovať rozvoj metabolických porúch, ako je cukrovka, hypertenzia a tiež aterosklerózy. D-pinitol, D-chiro-inozitol a sekvojitol má aj inzulín-napodobujúce účinky. Myo-inozitol spolu s D-chiro-inozitolom dokáže zlepšiť vývoj kostí a minerálnu hustotu kostí, čím potláčajú osteoklastogenézu alebo môžu zlepšiť plodnosť u žien so syndrómom polycystických vaječníkov (PCOS). Myo-inozitol a ostatné cyklitoly majú aj antioxidačné, protizápalové a protirakovinové vlastnosti [5, 6].

Magnólia Soulangeova (*Magnolia soulangeana*) je asi najviac pestovaným druhom spomedzi mnohých druhov magnólií. Napriek tomu, že najznámejšia *Magnolia officinalis* je využívaná v tradičnej čínskej medicíne pre svoje bioaktívne neolignany, našim cieľom bolo identifikovať iné prospešné fytochemikálie, inozitoly, vo viac dostupnom druhu, *Magnolia soulangeana*, čím by sa mohla stať ešte zaujímavejším, podobne využiteľným druhom magnólie.

Materiál a metódy

Kvety magnólie Soulangeovej (*Magnolia soulangeana*) boli lyofilizované pre zachovanie obsahu látok a po podrvení boli kvety extrahované v metanole. Extrakt bol homogenizovaný 30 min pri laboratórnej teplote ultrazvukovým homogenizátorom s pulzom 10 s x 1 s (Bandelin Sonopuls HD 3100), aby bol lepší výtlačok. 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 µl pyridínu a 50 µl acetanhydridu v termobloku (Block heater SBH130D STUART) 1 hod pri 80 °C. Po acetylácii sa nechala vzorka odpariť do sucha a rozpustila v acetonitrile.

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 (30 m x 0.25 mm x 0.2 µm) 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

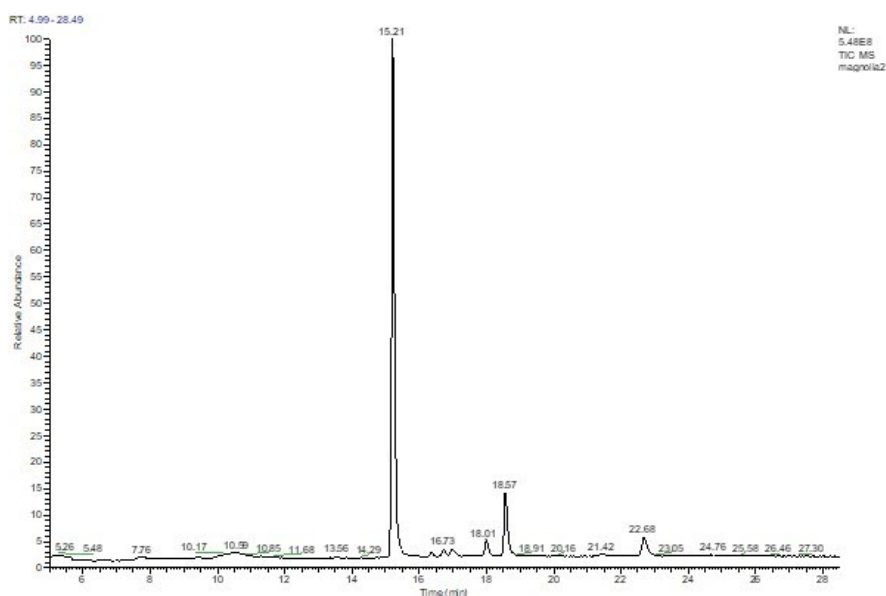
(70 eV) a kvadrupólový analyzátor pracoval v skenovacom režime v hmotnostnom rozsahu 40-450 m/z. Chemikálie LC-MS čistoty, použité na extrakciu, prípravu a analýzy vzoriek, ako aj štandardov, boli získané od firiem VWR Chemicals (Poľsko), Honeywell Chromasolv (Nemecko). Štandardy inozitolov (D-ononitol, sekvojitol, D-pinitol, D-chiro-, allo-, epi-, neo-, scyllo-, mucu-, myo-inozitol) boli zakúpené od firiem Carbosynth (Spojené kráľovstvo), Sigma-Aldrich (Švajčiarsko).

Výsledky a diskusia

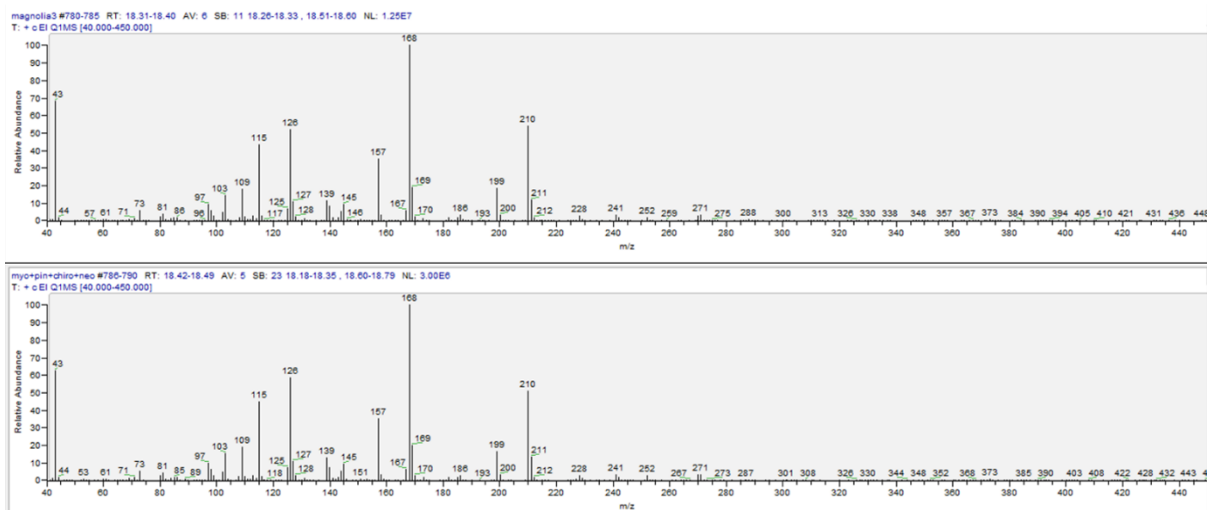
Analýzou extraktu kvetov rastliny *Magnolia soulangeana* plynovou chromatografiou na polárnej kolóne SP-2330 sa získal chromatogram eluovaných inozitolov. V študovanej rastline boli identifikované 2 inozitoly a 2 metyléter inozitoly, ktoré sa pravdepodobne nachádzajú v rastline vo voľnej forme (Obr. 1).

V analyzovanom extrakte kvetov boli identifikované aj acetylované hexózy (16,73 min a 16,97 min), ale ani pomalý teplotný gradient 2 °C/min z teploty 230 °C na 250 °C nebol schopný zabezpečiť ich dostatočnú separáciu. Voľné sacharidy však neboli cieľom našej štúdie (Obr. 1).

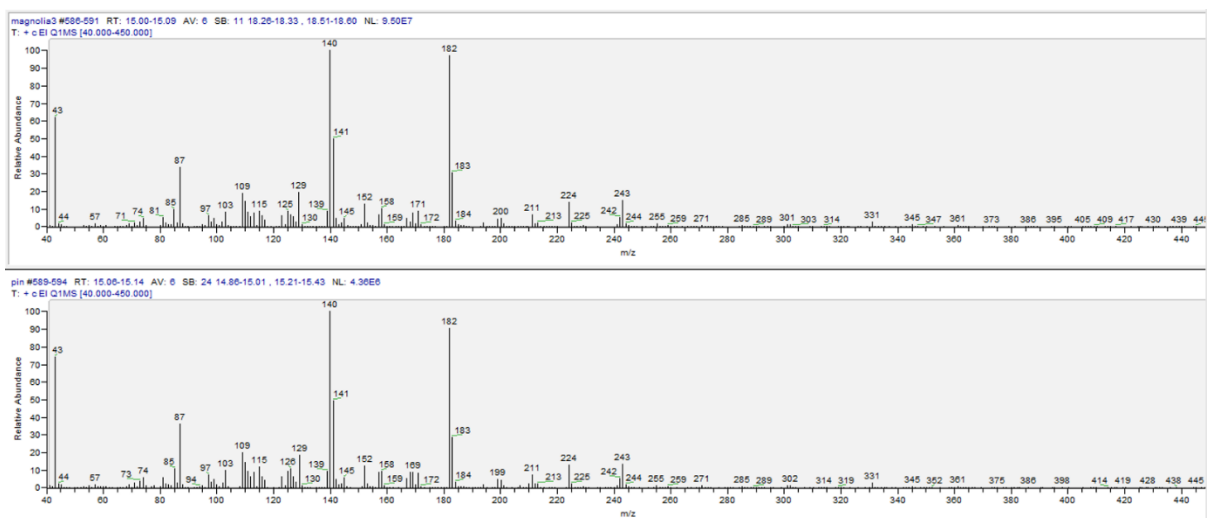
V extrakte kvetov magnólie Soulangeova boli analyzované inozitoly potvrdené hmotnostnými spektrami a retenčnými časmi rôzne eluujúcich rovnako pripravených acetylovaných štandardov inozitolov a metyléter inozitolov. Na obr. 2, 3 je porovnané MS spektrum inozitolu, metyléter inozitolu v extrakte a príslušného štandardu (Obr. 2, 3).



Obr.1. Chromatogram inozitolov, metyl-éter derivátov v extrakte kvetov *Magnolia soulangeana*
D-pinitol (15,21 min), chiro-inozitol (16,36 min), ononitol (18,01 min), myo-inozitol (18,57 min)



Obr. 2. MS spektrum acetylovaného inozitolu D-chiro-inozitolu v extrakte a štandardu



Obr. 3. MS spektrum acetylovaného metyléter inozitolu D-pinitolu v extrakte a štandardu

Tab. 1 znázorňuje relatívne (plošné) percentá zastúpenia inozitolov v extrakte kvetov *Magnolia soulangeana* v danom poradí s príslušnými retenčnými časmi a charakteristické ióny fragmentácie. V magnólii Soulangeova bol identifikovaný D-pinitol ako dominantný (84,33 %) voči ďalším trom inozitolom, ononitolu, chiro- a myo-inozitolu. Ako druhý je najviac zastúpený myo-inozitol (12,22 %), ktorý sa v prírode najviac vyskytuje. Potom ononitol s 2,73 % a chiro-inozitol s 0,71 %-ným zastúpením v extrakte. Najväčšie zastúpenie D-pinitolu môže súvisieť s jeho úlohou ochrániť rastlinu pred nepriaznivými podmienkami prostredia, alebo s tým, že myo-inozitol môže byť metyltransferázou metylovaný na ononitol a potom sa prostredníctvom epimerázovej reakcie premení na pinitol, čo by vysvetľovalo aj menšie zastúpenie ononitolu [1].

Tab. 1. Relatívne percentá [%] zastúpenia jednotlivých inozitolov v kvetoch *Magnolia soulangeana* a charakteristické ióny fragmentácie

	Plocha [%]	RT [min]	MS fragmenty
D-pinitol	84,33	15,21	43, 87, 109, 129, 140 , 141, 152, 182 , 183, 211, 224, 243
chiro-inozitol	0,71	16,36	43, 103, 109, 115, 126, 139, 145, 157, 168 , 199, 210
ononitol	2,73	18,01	43, 87, 109, 129, 140 , 141, 152, 182 , 183, 211, 224, 243
myo-inozitol	12,22	18,57	43, 103, 109, 115, 126, 139, 145, 157, 168 , 199, 210

Záver

V extrakte kvetov *Magnolia soulangeana* boli porovnaním s retenčnými časmi a hmotnostnými spektrami štandardov identifikované 2 metyléter inozitoly a 2 inozitoly v eluovanom poradí: *D-pinitol*, *chiro-inozitol*, *ononitol*, *myo-inozitol*. Hmotnostná spektrometria hrá významnú úlohu pri jednoznačnej identifikácii, z toho dôvodu je spojenie GC-MS výhodné aj pri identifikácii skupiny cyklitolov. Tak ako je využívaná *Magnolia officinalis* s obsahom neolignanov v tradičnej čínskej medicíne na zlepšenie gastrointestinálnej aktivity, regulácie respiračnej aktivity pri astme, kašli, ale aj pri liečení ochorenia COVID-19, možno predpokladať, že *Magnolia soulangeana* by mohla mať tiež potencionálne liečivé účinky vďaka inozitolom, ktoré majú antioxidačné, protizápalové a protirakovinové vlastnosti.

PodĎakovanie

Tento príspevok vznikol s podporou Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: ITMS: 313011ATT2, spolufinancovaný z Európskeho fondu regionálneho rozvoja a bol podporený Slovenskou grantovou agentúrou VEGA (Grant č. 1/0116/22).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Al-Suod H., Ligor M., Raŕiu 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(3), p. 778
- [3] Endringer D. C., Pezzuto J. M., Braga F. C. (2009) *Phytomed.* 16, p. 1064
- [4] Monastra G, Vucenik I, Harrath A. H., et al. (2021) *Front. Endocrinol.* 12, p. 660381
- [5] Owczarczyk-Saczonek A., Lahuta L. B., Ligor M., et al. (2018) *Nutrien.* 10(12), p. 1891
- [6] Lagana A. S., Garzon S., Casarin J., et al. (2018) *Trends Endocrinol Metab* 29(11), p.768