

Florentyna Wanda KUDRZYCKA-BIEŁOSZABSKA,
Danuta SZANIAWSKA-DEKUNDY,
Wiesława PIKULA

Wstępne badania steroli i trójterpenów w ziele *Nepeta nuda* L.

Предварительные исследования стеролов и тритерпенов в траве *Nepeta nuda* L.

Preliminary Investigation on Sterols and Triterpenes in the *Nepeta nuda* L. Herb.

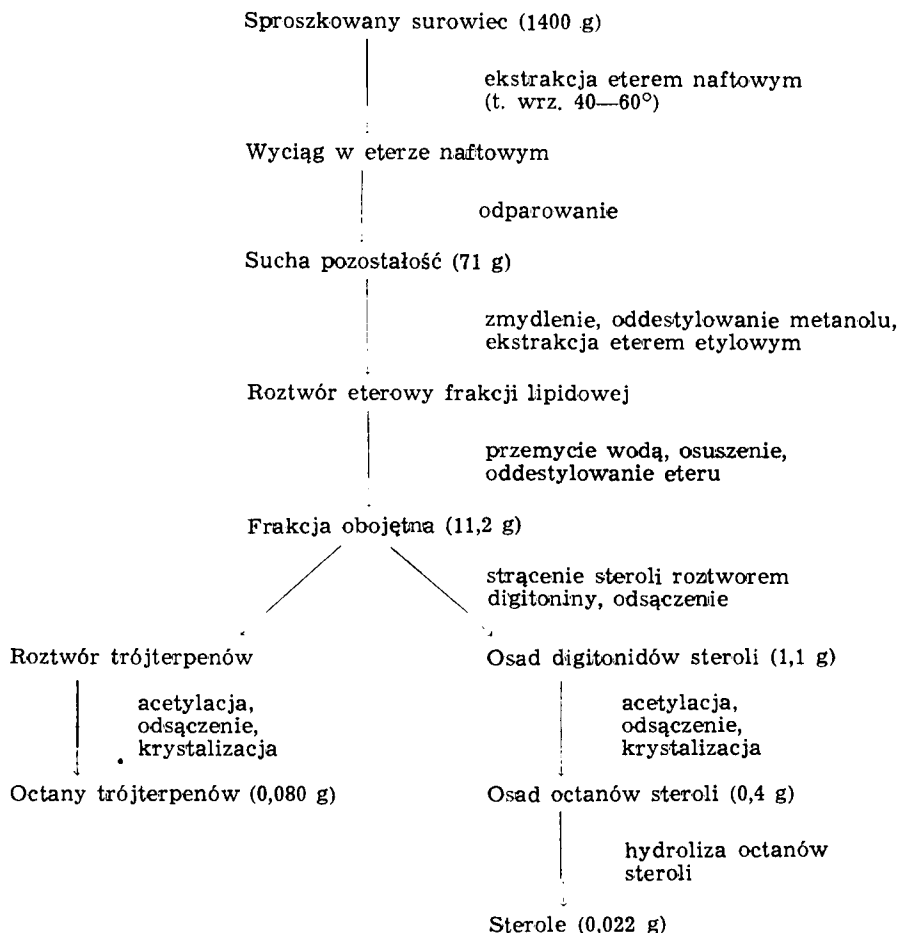
Kocimiętka naga (*Nepeta nuda* L.) jest szeroko rozpowszechniona w świecie roślinnym, głównie na kontynencie europejskim i azjatyckim (9). W Polsce jej naturalne stanowiska znajdują się w południowej części niżu, na podgórzu Karpat, w dolinie Dunajca, na wyżynie Małopolskiej i Lubelskiej i w północno-wschodniej części kraju (20). Wg Brody i Mowszowicza (2) ziele kocimiętki nagiej stosowane jest w lecznictwie ludowym podobnie jak ziele *Nepeta cataria* L., tj. jako środek przeciwbiegunkowy, przeciwskurczowy, pobudzający, napotny, pomocny w nieżytach płuc, anemii oraz przy wzdęciach (4, 5). Skład chemiczny kocimiętki nagiej nie był jeszcze dotychczas badany. Prowadzone w ostatnich latach w ZSRR (8, 14, 15), Hiszpanii (1), Indiach (7, 21) i Japonii (17) badania innych gatunków kocimiętki dotyczą najczęściej składu chemicznego olejku eterycznego, ale mówią także o obecności w niektórych surowcach flawonoidów, laktonów, steroli i trójterpenów. Wyniki przytoczonych badań pozwalają przypuszczać, że związki te mogą być obecne również w kocimiętce nagiej. Celem pracy było więc zbadanie, czy w omawianym gatunku kocimiętki znajdują się sterole i trójterpeny, a w razie potwierdzenia obecności — próba ich identyfikacji.

BADANIA WŁASNE

Materiał pochodził z upraw w Ogrodzie Farmakognostycznym AM w Lublinie. Kwitnące ziele ścięto w lipcu 1971 r., wysuszono w warunkach naturalnych i zmielono przed badaniem. Wstępne badania przeprowadzone z surowym wyciągiem eterowym (ekstrakcja eterem naftowym o temp. wrzenia 40—60° w aparacie Soxhleta) wykazały dodatnią reakcję Liebermanna-Burcharda, Salkowskiego oraz Brie-

skorna-Brinera (11). Wobec powyższego przeprowadzono dalszą ekstrakcję większej ilości surowca w aparacie obiegowym firmy Quickfit oraz izolację steroli i trójterpenów zgodnie ze schematem:

Schemat wyodrębnienia steroli i trójterpenów



Ekstrakcję surowca prowadzono aż do uzyskania wyciągu nie dającego reakcji Liebermanna-Burcharda. Po zagęszczeniu wyciągu eterowego uzyskano ciemnozielonobrunatną gęstą pozostałość, stanowiącą 5,7% suchej masy użytego surowca. Zmydlenie przeprowadzono 10-krotną ilością 20% metanolowego roztworu KOH przez 6-godzinne ogrzewanie pod chłodnicą zwrotną. Następnie odparowano metanol z parą wodną, a pozostałość ekstrahowano wielokrotnie eterem etylowym aż do uzyskania bezbarwnych wyciągów. Połączone wyciągi eterowe przemyto wodą

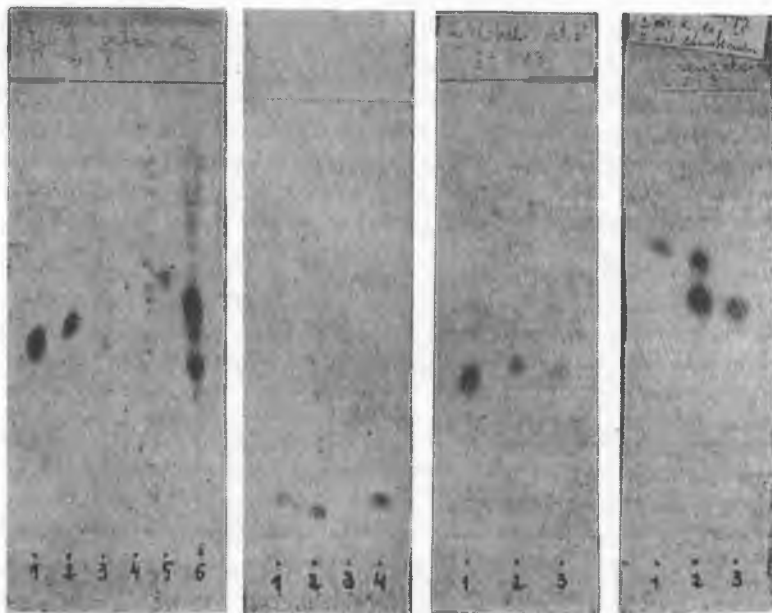
z lodem do zaniku alkalicznego odczynu warstwy wodnej, a po osuszeniu bezwodnym siarczanem sodu odparowano do sucha, otrzymując pomarańczowobrunatną, bezpostaciową masę. Część otrzymanego wyciągu (9 g) rozpuszczano w gorącym etanolu i wytrącano digitonidy steroli przez dodanie nadmiaru 1% etanolowego roztworu digitoniny (11) i 1-godzinne ogrzewanie w temp. 70°. Otrzymany osad digitonidów steroli przemyto gorącym etanolem, acetonem i eterem etylowym, a następnie poddano acetylacji bezwodnikiem kwasu octowego. Otrzymany osad octanów steroli przekrystalizowano uzyskując substancję krystaliczną o t.t. 126—129°.

W wyniku hydrolizy przeprowadzonej 5% etanolowym roztworem KOH i kilkakrotnej krystalizacji z metanolu uzyskano mieszaninę wolnych steroli (t.t. 121—126°). Roztwór trójterpenów (po odsączeniu digitonidów steroli) odparowano, czerwono-brunatną pozostałość rozpuszczono w acetonie i poddano acetylacji. Otrzymane po krystalizacji octany trójterpenów miały t.t. 116—118°.

Badaniom chromatograficznym poddano zarówno frakcję obojętną (sterole i trójterpeny), jak i octany steroli, wolne sterole i octany trójterpenów. Posłużono się techniką cienkowarstwową na żelu krzemionkowym G i żelu krzemionkowym G impregnowanym azotanem srebra (30g SiO₂+13g AgNO₃+60 ml H₂O) (3, 12, 18) stosując szereg podanych w literaturze układów rozpuszczalników (3, 6, 10, 11, 16, 19). Chromatogramy rozwijano metodą wstępującą (30—40 min.), wywoływano 50% kwasem siarkowym (6) lub nasyconym roztworem trójchlorku antymonu w chloroformie (11). Plamy na chromatogramach identyfikowano na podstawie porównań wartości R_f oraz zabarwienia w świetle dziennym i nadfioletowym z użytymi wzorcami. Frakcja obojętna rozdzielała się na 9 słabo zróżnicowanych plam, z których jedna wykazywała zgodność wartości R_f i zabarwienia z wzorcowym β-sitosterolem, dwie następne miały wartości R_f i zabarwienie zbliżone do stigmasterolu i lanosterolu i sugerowały ich obecność. Chromatografia cienkowarstwowa octanów steroli, przeprowadzona w kilku układach rozpuszczalników, nie dawała rozdziału badanej frakcji. Każdorazowo otrzymywano 1 plamę o wartościach R_f zgodnych ze wzorcem octanu β-sitosterolu. Chromatografia cienkowarstwowa wolnych steroli, podobnie jak octanów, nie dawała rozdziału. We wszystkich przypadkach otrzymywano 1 plamę, która wartością R_f i zabarwieniem odpowiadała wzorcowi β-sitosterolu. Należy zaznaczyć, że niektóre chromatogramy rozwijano dwukrotnie tym samym układem w celu uzyskania ewentualnie lepszego rozsunienia plam.

Najlepsze wyniki rozdziału chromatograficznego octanów trójterpenów uzyskano na żelu krzemionkowym G impregnowanym AgNO₃ w układzie benzen-eter naftowy (2:3). Uzyskano rozdział octanów badanej frakcji trójterpenowej na 2 plamy, które zabarwieniem i wartościami R_f odpo-

wiadały octanowi α -amyryny i octanowi lanosterolu. Wyniki chromatografii cienkowarstwowej przedstawiają fotogramy ryc. 1 do 4.



Ryc. 1. Chromatogram frakcji obojętnej na żelu krzemionkowym G; faza nośna: eter naftowy — octan etylu (3:1); wywoływacz: 50% H_2SO_4 ; substancje wzorcowe: 1) β -sitosterol, 2) stigmasterol, 3) α -spinasterol, 4) ergosterol (niewidoczny na zdjęciu), 5) lanosterol, 6) roztwór benzenowy frakcji obojętnej

Thin-layer chromatogram of neutral fraction on Silica gel G

Ryc. 2. Chromatogram octanów steroli na żelu krzemionkowym G; faza nośna: cykloheksan — octan etylu (98:2), wywoływacz: 50% H_2SO_4 ; substancje wzorcowe: 1) octan β -sitosterolu, 2) octan ergosterolu, 3) octan α -spinasterolu (niewidoczny na zdjęciu), 4) badane octany steroli

Thin-layer chromatogram of sterols acetates on Silica gel G

Ryc. 3. Chromatogram wolnych steroli na żelu krzemionkowym G; faza nośna: cykloheksan — octan etylu (87:13); wywoływacz: 50% H_2SO_4 ; substancje wzorcowe: 1) β -sitosterol, 2) stigmasterol, 3) badane sterole

Thin-layer chromatogram of sterols on Silica gel G

Ryc. 4. Chromatogram octanów trójterpenów na żelu krzemionkowym G impregnowanym $AgNO_3$; faza nośna: benzen — eter naftowy (2:3), wywoływacz: 50% H_2SO_4 ; substancje wzorcowe: 1) octan α -amyryny, 2) badane octany trójterpenów, 3) octan lanosterolu

Thin-layer chromatogram of triterpenes acetates on Silica gel G impregnated with $AgNO_3$

Metodą chromatografii preparatywnej na żelu krzemionkowym G wyizolowano osad o t.t. 129—135°, który po zmieszaniu ze wzorcowym β -sitosterolem nie dawał depresji temperatury topnienia. Oznaczono ogólną

zawartość steroli i trójterpenów metodą kolorymetryczną Liebermanna-Burcharda w modyfikacji Laskowskiego (13). Oznaczenie wykonano w spektrofotometrze Spekol przy długości fali 620 nm, porównując wynik z krzywą kalibracji wykreśloną przy użyciu wzorcowego β -sitosterolu. Całkowita ilość steroli i trójterpenów w ziele kocimiętki nagiej oznaczona tą metodą wynosiła 213 mg%. Zawartość steroli oznaczona metodą wagową (wytrącenie steroli w postaci digitonidów) wynosiła 129,7 mg%.

Zestawienie wyników i wnioski

1. Wyniki przeprowadzonych prób jakościowych świadczą o obecności w surowcu związków sterolowych i trójterpenowych.

2. Ogólna zawartość steroli i trójterpenów w ziele wynosi 213 mg%. Zawartość steroli oznaczona metodą wagową wynosi 129,7 mg%.

3. Chromatografia cienkwarstwowa frakcji obojętnej (lipidowej) wykazała obecność 9 plam, z których 3 odpowiadały wartościami R_f i zabarwieniem wzorcom β -sitosterolu, stigmasterolu i lanosterolu.

4. Chromatografia cienkwarstwowa octanów steroli i wolnych steroli potwierdziła obecność β -sitosterolu. Związek ten uzyskano także w wyniku chromatografii preparatywnej.

5. Chromatografia cienkwarstwowa frakcji octanów trójterpenów wykonana na żelu krzemionkowym G impregnowanym azotanem srebra wykazała obecność dwóch składników, których wartości R_f odpowiadały wzorcom α -amyryny i lanosterolu.

PIŚMIENNICTWO

1. Breton F., Jose L., Gonzales G., De Lon G.: An. Quim. 65 (6), 621, 1969, wg Chem. Abstr. 71, 102060, 1969.
2. Broda B., Mowszowicz J.: Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych, trujących i użytkowych, PZWL, Warszawa 1971.
3. Domagalina E., Zareba S.: Chem. Analit. 12, 261—265, 1967.
4. Dragendorff G.: Die Heilpflanzen, Stuttgart 1898.
5. Gessner O.: Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa, Heidelberg 1953.
6. Główniak K.: Badania fitochemiczne nad *Chaerophyllum hirsutum* L., praca doktorska, Lublin 1971.
7. Gupta Y. N., Baslas K. K., Chanhan R. N., Singh: Indian oil Soap J. 36 (9), 257, 1971, wg Chem. Abstr., 76, 89932, 1972.
8. Gurwich N. L., Mamiedaliewa F. M., Mischurova S. S.: Izv. Akad. Nauk Azerb. SSR, Ser. Biol. Nauk 2, 31, 1966 wg Chem. Abstr., 65, 18990, 1967.
9. Hegi G.: Illustr. Flora von Mittel-Europa, Bd. V, München 1927.
10. Ikan R.: J. Chromat. 17, 591—593, 1965.
11. Jerzmanowska Z.: Substancje roślinne. Metody wyodrębniania. PWN, Warszawa 1967.
12. Krzysztofik B., Ludwiczak R. S.: Roczn. Chemii, 45, 355—365, 1971.

13. Laskowski K.: Prace Inst. Przem. Mlecz., 7, 2—20, 1961.
 14. Mamiedaliewa F. M.: Uch. Zap. Azerb. Gos. Univ., Ser. Biol. Nauk., 2, 55, 1965, wg Chem. Abstr., 66, 26607, 1967.
 15. Nasudari A. A., Mischurova S. S.: Izv. Akad. Nauk. Azerb. SSR, Ser. Biol. Nauk, 4, 12, 1971, wg Chem. Abstr., 76, 96933, 1972.
 16. Rutkowski A., Jacini G., Capella P., Cirimelo M.: Roczniki Techn. i Chem. Żywn., 12, 23—37, 1966.
 17. Sakan T., Sachihiko Isoe, Hyeon S. Be, Rynicki K., Maeda T., Wolinsky J., Dickerson D., Slabaugh M., Nelson D.: Tetrahedron Letters, 46, 4097, 1965, wg Chem. Abstr., 64, 6695, 1966.
 18. Stahl E.: Dünnschicht-Chromatographie, Springer Verl., Berlin 1962.
 19. Stevens P. J.: J. Chromat. 36, 253—258, 1968.
 20. Szafer W., Kulczyński S., Pawłowski B.: Rośliny polskie, PWN, Warszawa 1953.
 21. Usman Ahmed Siddiqui, Ahsan A. M.: Pakistan J. Sci. Ind. 10, 1, 1967, wg Chem. Abstr., 68, 27522, 1968.
- Otrzymano 15 IV 1975.

РЕЗЮМЕ

Хроматографическое исследование травы *Nepeta nuda* L. показало присутствие во фракции стеролов и тритерпенов 9 соединений, из которых методом тонкослойной препаративной хроматографии авторы выделили и идентифицировали β -ситостерол. Кроме того, было установлено, что последующих 3 соединений цвет пятен и Rf характеристичны для стигмастерола, ланостерола и α -амирина.

Количественное содержание суммы стеролов и тритерпенов, определяемое колориметрическим методом, составляет 213 мг%, а гравиметрическим методом — 129,7 мг%.

SUMMARY

Nine compounds of sterols and triterpenes groups were found chromatographically in the *Nepeta nuda* L. herb. By using the preparative thin-layer chromatography method, β -sitosterol was isolated and identified, further 3 compounds gave Rf values and colour reactions characteristic for stigmasterol, lanosterol and α -amyirin.

By the application of the colorimetric method, 213 mg% of total sterols and triterpenes were found, the content of sterols determined gravimetrically was 129,7 mg%.