

Određivanje sastava petroletarskog ekstrakta droge *Maydis stigma* primenom GC-MS

Zoran Maksimović¹, Shao-Qing Cai, Shi-Wen Dong²

¹ Institut za farmakognoziju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija i Crna Gora

² Institut za farmakognoziju, Fakultet farmaceutskih nauka, Centar za zdravstvene nauke Univerziteta u Pekingu, 38 Xue-Juan Road, Haidian District, 100083 Beijing, China

Kratak sadržaj

U ovom radu, prikazani su rezultati ispitivanja hemijskog sastava petroletarskog ekstrakta droge *Maydis stigma* primenom GC-MS. Analizom frakcije saponifikovanih materija, identifikovano je 15 masnih kiselina. Glavni sastojak je oktadekanska kiselina, koja čini 17,3 % ispitivane smese. Značajno su zastupljene eikozanska i oktadekadienska kiselina, koje čine 16,0 odnosno 10,7 % ispitivane frakcije. Analizom nesaponifikovanih materija, identifikovano je 20 komponenata. Nesaponifikovane materije petroletarskog ekstrakta droge *Maydis stigma* karakteriše visok sadržaj n-alkana (53,0 %) i fitosterola (37,4 %), dok ostatak čine triterpeni (α -amirin i fridelin) i karotenoidi. Glavni sastojak frakcije fitosterola je β -sitosterol (23 %), dok je među ugljovodonicima dominantan alkan $C_{29}H_{60}$ (15,1 %).

Ključne reči: Kukuruzna svila, *Maydis stigma*, *Zea mays* ssp. *mays*, oktadekanska kiselina, eikozanska kiselina, oktadekadienska kiselina, sitosterol.

* Autor za korespondenciju. E-mail: zmaksim1@pharmacy.bg.ac.yu

Uvod

Kukuruzna svila (*Maydis stigma*) je biljna droga koja je u širokoj upotrebi u narodnoj medicini, ne samo Srba i naroda koji žive na Balkanskom poluostrvu, već i onih u oblastima gde klimatski i drugi uslovi dozvoljavaju gajenje kukuruza. U svim ovim etnomedicinskim sistemima, primena droge *Maydis stigma* ima veoma slične aspekte: koristi se kao blag diuretik, za izbacivanje kamena i peska iz bubrega i mokraćne bešike, kod cistitisa, gihta, hroničnog nefritisa, benigne hiperplazije prostate i sličnih oboljenja urogenitalnog trakta, kao i protiv reumatizma i reumatoidnog artritisa, najčešće u obliku infuza, dekokta ili vodeno-alkoholnog ekstrakta namenjenih peroralnoj upotrebi (1-5). Međutim, iako se ova droga često koristi u opisanom indikacionom području, obeležja kvaliteta ove droge nisu definisana (izuzev nekih osnovnih parametara), što otvara širok prostor za raznovrsna istraživanja. U ovom radu prezentujemo rezultate ispitivanja hemijskog sastava petroletarskog ekstrakta ove droge, kao potencijalnog nosioca nekih farmakoloških efekata primene kukuruzne svile.

Eksperimentalni deo

Poreklo i ekstrakcija biljnog materijala

Kukuruzna svila korišćena u ovom istraživanju, nabavljena je u Institutu za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd i predstavlja komercijalni proizvod, koji se pod nazivom "svila od kukuruza" nalazi u mreži biljnih apoteka Srbije i Crne Gore. Biljni materijal (1700 g) je samleven do stepena usitnjenosti grubog praška (sito 0,75) i ekstrahovan petroletrom (40-70 °C). Petroletarski ekstrakt je uparen pod sniženim pritiskom, a zatim rastvoren u smesi toluen-apsolutni etanol (1:1, V/V), ponovo uparen i sušen u vakuum-eksikatoru na sobnoj temperaturi do konstantne mase.

Saponifikacija petroletarskog ekstrakta

Saponifikacija uzorka suvog petroletarskog ekstrakta vršena je alkoholnim rastvorom KOH uz zagrevanje, uobičajenim postupkom (6). Na ovaj način, izvršeno je istovremeno određivanje sadržaja nesaponifikovanih materija (uzorak B), saponifikovanih materija (uzorak A) i njihova izolacija za potrebe instrumentalne analize.

Analiza sastava frakcije saponifikovanih materija primenom GC-MS

Jedan deo (0,5 g) uzorka A je u normalnom sudu od 25 ml pomešan sa 2,5 ml smese dietiletra i n-heksana (2:1, V/V), 2,5 ml metanola i 2,5 ml 0,8 mol/l rastvora KOH u metanolu. Smesa je ostavljena da reaguje tačno 5 minuta, nakon čega je normalni sud dopunjen vodom do oznake, a sadržaj snažno promućkan. Po razdvajanju faza, gornji sloj (koji sadrži metilestre masnih kiselina) je odvojen i analiziran primenom GC-MS.

Za analizu metilestara masnih kiselina, korišćen je gasni hromatograf ThermoQuest CE Instruments Trace GC 2000 series sa DB 5 MS kolonom (dužina 30 m, unutrašnji dijametar 0,2 mm) i ThermoQuest Finnigan Trace MS masenim detektorom. Jonizacija je vršena tehnikom elektronskog udara (EI+, energija jonizacije 70 eV), a razdvajanje komponenata smese protokom helijuma kao gasa-nosača uz temperaturni program prikazan u Tabeli I. Za akviziciju podataka, korišćen je Xcalibur softver, a identifikacija sastojaka smese vršena je poređenjem masenih spektara eluiranih komponenata sa spektrima sadržanim u NIST Online Library of Mass Spectra.

Tabela I

Temperaturni program analize saponifikovanih materija primenom GC-MS

Table I

Temperature programming for the GC-MS analysis of saponifiable matter

Inicijelna temperatura	80 °C, 3 minuta
Gradijent I	5 °C/min do 250 °C;
Gradijent II	10 °C /min do 290 °C,
Završna temperatura:	290 °C, 15 minuta

Analiza sastava frakcije nesaponifikovanih materija primenom GC-MS

Jedan deo (0,5 g) uzorka B je rastvoren u 10 ml n-heksana i analiziran direktno, bez prethodne hemijske derivatizacije. Analiza frakcije nesaponifikovanih materija, izvršena je uz iste eksperimentalne uslove, uz temperaturni program prikazan u Tabeli II.

Tabela II

Temperaturni program analize nesaponifikovanih materija primenom GC-MS

Table II

Temperature programming for the GC-MS analysis of non-saponifiable matter

Inicijalna temperatura	80 °C, 2,5 minuta
Gradijent I	15 °C /min do 150 °C;
Gradijent II	2 °C /min do 275 °C,
Gradijent III	10 °C /min do 290 °C
Završna temperatura	290 °C, 15 minuta

Rezultati

Ekstrakcijom biljnog materijala, usitnjenog do konzistencije grubog praška, dobijeno je 15 g suvog petroletarskog ekstrakta (0,9 %, računato na masu droge), žutozelene, polučvrste materije voskaste konzistencije, prijatnog mirisa i uljastog ukusa. Prethodnom mikroskopskom analizom uzoraka droge, nije ustanovljena intracelularna lokalizacija masnog ulja, niti bilo koji drugi vid ćelijske organizacije koja akumulira masti kao rezervnu hranljivu materiju. Izolovani petroletarski ekstrakt sadrži, prema tome, sastojke epikutikularne voštane prevlake, sastojke kutikule ili sastojke ćelijskih membrana.

Rezultati određivanja sadržaja nesaponifikovanih materija

Ustanovljeno je da nesaponifikovane materije predstavljaju 58 % mase izolovanog petroletarskog ekstrakta, što je jedna od osnovnih karakteristika voskova.

Rezultati određivanja sastava frakcije saponifikovanih materija primenom GC-MS

Ukupne masne kiseline petroletarskog ekstrakta droge *Maydis stigma* nakon saponifikacije uzorka, identifikovane su i određene primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom, u obliku odgovarajućih metilestara, a rezultati su prikazani u Tabeli III.

Najzastupljenija komponenta frakcije saponifikovanih materija petroletarskog ekstrakta droge *Maydis stigma* identifikovana je kao oktadekanska (stearinska) kiselina (17,3 %). Pored stearinske, u značajnoj meri su zastupljene eikozanska (16,0 %) i oktadekadienska (linolna) kiselina

(10,7 %), dok su masne kiseline kratkog i vrlo dugog ugljovodoničnog niza prisutne u znatno nižim koncentracijama.

Uočava se da zasićene masne kiseline dominiraju u odnosu na nezasićene: odnos nezasićenih i zasićenih masnih kiselina je približno 1:2.

Tabela III

Sastav frakcije saponifikovanih materija

Table III

Composition of the saponifiable matter fraction

Rt (min)	Sastojak (metilestri)	%
20,47	Dodekanska kiselina (C _{12:0})	t
25,93	Tetradekanska kiselina (C _{14:0})	0,5
26,99	Pentadekanska kiselina (C _{15:0})	0,5
27,19	Heksadecenska kiselina (C _{16:1})	0,5
27,64	Heksadekanska kiselina (C _{16:0})	4,8
29,59	Heptadekanska kiselina (C _{17:0})	0,4
30,86	Oktadekadienska kiselina (C _{18:2})	10,7
30,98	Oktadecenska kiselina (C _{18:1})	6,9
32,09	Oktadekanska kiselina (C _{18:0})	17,3
32,68	Eikosenska kiselina (C _{20:1})	1,8
35,36	Eikozanska kiselina (C _{20:0})	16,0
36,25	Heneikozanska kiselina (C _{21:0})	t
38,13	Dokosanska kiselina (C _{22:0})	0,4
39,38	Trikosanska kiselina (C _{23:0})	0,5
40,44	Tetrakosanska kiselina (C _{24:0})	0,5

t = u tragovima (< 0,1 %)

Rezultati određivanja sastava frakcije nesaponifikovanih materija primenom GC-MS

Najzastupljenije komponente frakcije nesaponifikovanih materija identifikovane su kao β-sitosterol (23,0 %), alkani C₂₉H₆₀ (15,1 %),

C₄₀H₈₂ (9,7 %) i C₂₇H₅₆ (8,5 %), te stigmasterol (7,2 %). Sastav frakcije nesaponifikovanih materija petroletarskog ekstrakta droge *Maydis stigma* karakteriše visok sadržaj ugljovodonika: 53 % identifikovanih komponenata predstavljaju ugljovodonici ravnog niza, koji čine homologi niz alkana. Nezasićeni ugljovodonici (alkeni) su detektovani samo u tragovima, a prisustvo ugljovodonika razgranatog niza nije utvrđeno (Tabela IV).

Tabela IV

Sastav frakcije nesaponifikovanih materija

Table IV

Composition of the non-saponifiable matter fraction

Rt (min)	Komponenta	%
23,04	C ₂₂ H ₄₆	0,4
24,77	C ₂₃ H ₄₈	1,9
26,41	C ₂₄ H ₅₀	1,2
28,03	C ₂₅ H ₅₂	3,6
29,53	C ₂₆ H ₅₄	1,2
31,11	C ₂₇ H ₅₆	8,5
31,68	C ₂₆ H ₅₂	t
32,47	C ₂₈ H ₅₈	2,9
33,81	C ₂₉ H ₆₀	15,1
34,27	C ₃₀ H ₆₂	0,6
35,85	C ₃₀ H ₆₀	t
34,94	C ₃₆ H ₇₄	2,5
36,50	C ₄₀ H ₈₂	9,7
38,71	Kampesterol	3,4
39,19	Stigmasterol	7,2
40,37	α-Amirin	4,0
40,69	β-Sitosterol	23,0
42,83	Karotenoid 1	0,8
44,07	Karotenoid 2	0,6
45,90	Fridelin	4,6

t = u tragovima (< 0,1 %)

Diskusija

Rezultate ispitivanja sastava petroletarskog ekstrakta droge *Maydis stigma* je teško dovesti u korelaciju sa raspoloživim literaturnim podacima (7-9). Pomenuta saopštenja se odnose na sastav epikutikularnih voskova listova kukuruza, lipida polena ili sastav lipida plazma-membrane ćelija korena ove biljke. Hemijski sastav epikutikularnih voskova žigova ženskog cveta (kukuruzne svile) do sada nije ispitivan, te pouzdana poređenja nije moguće izvesti. Ipak, pažnju privlači podatak da je i u lipidima polena kukuruza utvrđen visok sadržaj ugljovodonika (preko 55 %) koji, nasuprot našim rezultatima, uglavnom čini homologni niz alkena.

Sastav frakcije masnih kiselina je nešto podudarniji: i u lipidima polena i u kukuruznoj svili masne kiseline kratkog i dugog niza imaju mali udeo, dok je sadržaj kiselina $C_{16:1}$ i $C_{18:0}$ približan. Odnosi između drugih sastojaka su nešto drugačiji: kiselina $C_{16:0}$, koja je u lipidima polena kukuruza jedna od najznačajnijih komponenata, u lipidima kukuruzne svile predstavlja manje zastupljen sastojak. Slično razmatranje važi i za kiseline $C_{18:1}$ i $C_{18:2}$, dok je u slučaju $C_{20:0}$ odnos obrnut u korist kukuruzne svile.

Steroli čine 37,4 % identifikovanih sastojaka frakcije nesaponifikovanih materija. Među njima, dominantan je β -sitosterol, dok je udeo stigmasterola i kampesterola znatno niži. Količine ovih sterola se jedne prema drugima odnose približno kao 7:2:1. Stigmasterol, kampesterol i β -sitosterol predstavljaju takođe dominantne komponente frakcije triterpenola polena kukuruza, ali se njihove količine međusobno odnose kao 8:1:1 (8).

Na kraju, 9,6 % identifikovanih komponenata frakcije nesaponifikovanih materija čine triterpeni α -amirin i fridelin, prisutni u približnim koncentracijama (4,0 odnosno 4,6 %).

Hemijski sastav petroletarskog ekstrakta kukuruzne svile moguće je dovesti u vezu sa nekim aspektima farmakološke aktivnosti ove droge. Jedna od značajnih, mada ne toliko poznatih etnomedicinskih indikacija primene ekstrakata droge *Maydis stigma* je terapija benigne hiperplazije prostate (BHP), koja ugrožava veliki deo muške populacije starije od 50 godina. U terapiji ovog funkcionalnog poremećaja koristi se nekoliko lekova, ali i standardizovani ekstrakti nekih lekovitih biljaka (10). Aktivni sastojci ovih biljaka pripadaju veoma različitim klasama prirodnih proizvoda; samim tim ni mehanizmi njihovog delovanja nisu uniformni. Nedavnim kliničkim ispitivanjima utvrđeno je da glavne aktivne sastojke ekstrakata koji se koriste u terapiji BHP predstavljaju masne kiseline $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{18:1}$ i $C_{18:2}$, kao i β -sitosterol (11,12). Prisustvo ovih sastojaka potvrđeno je i u petroletarskom ekstraktu droge

Maydis stigma, što implicira da bi odgovarajući, lipofilni ekstrakti ove droge takođe mogli da se koriste u terapiji početnih stadijuma BHP.

Nažalost, analitička metodologija primenjena u ovom istraživanju ne daje odgovor na pitanje da li su i u kojoj meri pomenute masne kiseline i fitosteroli prisutne u drogi u slobodnom obliku, ili se oslobađaju prilikom hidrolize iz di- i triglicerida, kao i frakcije esterifikovanih sterola. Međutim, rezultati ove studije nedvosmisleno ukazuju na neophodnost sprovođenja opsežnijih hemijskih i farmakoloških ispitivanja kojim bi se potvrdila mogućnost primene lipofilnog ekstrakta droge *Maydis stigma* u terapiji BHP.

Zahvalnica

Ovaj rad je delom ostvaren uz finansijsku podršku projekta br.1568 Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije.

Literatura

1. Bastien JW. Pharmacopeia of Qollahuaya Andeans. J Ethnopharmacol 1983; 8:97-111.
2. Cáceres A, Girón LM, Martínez AM. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. J Ethnopharmacol 1987; 19:233-45.
3. Willuhn G. *Maydis Stigma*. In: Wichtl M. Ed. Teedrogen und Phytopharmaka. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2002: 590.
4. Yeşilada E, Honda G, Sezik E, Tabata M, Fujita T, Tanaka T et al. Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. J Ethnopharmacol, 1995; 46:133-52.
5. Tucakov J. Lečenje biljem. Beograd: Rad, 1990:420-1.
6. Službeni list SFRJ. 25, 1973:840.
7. Avato P, Bianchi G, Pogna N. Chemosystematics of surface lipids from maize and some related species. Phytochemistry 1990; 29:1571-76.
8. Bianchi G, Murelli C, Ottaviano. Maize pollen lipids. Phytochemistry 1990; 29:739-44.
9. Bohn M, Heinz E, Lühje S. Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. Archives of Biochemistry and Biophysics 2001; 387:35-40.
10. Lowe FC, Fagelman E. Phytotherapy in the treatment of benign prostatic hyperplasia: an update. Urology 1999; 53:671-78.

11. Cristoni A, Di Pierro F, Bombardelli E. Botanical derivatives for the prostate. *Fitoterapia* 2000; 71 (1 Suppl): S21-S28.
12. Raynaud JP, Cousse H, Martin PM. Inhibition of type 1 and type 2 5 α -reductase activity by free fatty acids, active ingredients of Permixon[®]. *J Steroid Biochem Molec Biol* 2002; 82:233-39.

Determination of the chemical composition of *Maydis stigma* light-petroleum extract by GC-MS

Zoran Maksimović¹, Shao-Qing Cai, Shi-Wen Dong²

¹ Institute of Pharmacognosy, School of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia and Montenegro

² Institute of Pharmacognosy, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University Health Science Centre, 38 Xue-Juan Road, Haidian District, 100083 Beijing, China

Summary

In this paper, the results of the chemical composition investigations of light-petroleum extract of crude herbal drug *Maydis stigma* by means of GC-MS, were presented. Analysis of saponifiables resulted in identification of 15 fatty acids, with octadecanoic acid as the most prominent one (17,3 %). Eicosanoic and octadecadienoic acids (16,0 and 10,7 %, respectively) were also present in significant concentration. Analysis of non-saponifiables resulted in identification of 20 compounds. Non-saponifiable matter of *Maydis stigma* light-petroleum extract is characterized by high percentage of n-alkanes (53,0 %) and phytosterols (37,4 %), while the rest is composed mainly of triterpenes (α -amyrine and friedelin), as well as the carotenoids. The principal constituents of non-saponifiable matter fraction were identified as β -sitosterol (23 %) and alkane C₂₉H₆₀ (15,1 %).

Key words: Corn silk, *Maydis stigma*, *Zea mays* ssp. *mays*, octadecanoic acid, eicosanoic acid, octadecadienoic acid, sitosterol
