

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



Farmakologicky významné steroidní saponiny v rostlinách

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Tereza Trojanská
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2022

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Tereza Trojanská
Název práce	Farmakologicky významné steroidní saponiny v rostlinách
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	Diplomová práce pojednává o steroidních saponinech, které jsou sekundárními metabolity rostlin. Teoretická část se věnuje shrnutí informací o struktuře, biosyntéze, výskytu a biologické aktivitě steroidních saponinů a také o jejich stanovení v rostlinném materiálu. Dále je v práci popsán kotvičník zemní (<i>Tribulus terrestris</i>), známý svým obsahem steroidních saponinů. Experimentální část práce se zabývá optimalizací izolace, purifikace a kvantifikace vybraných steroidních saponinů z rostlinného materiálu.
Klíčová slova	Steroidní saponiny, <i>Tribulus terrestris</i> , SPE, UPLC-MS/MS
Počet stran	67
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Tereza Trojanská
Title of thesis	Pharmacologically important steroidal saponins in plants
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D.
The year of presentation	2022
Abstract	The diploma thesis deals with steroidal saponins which are secondary metabolites of plants. The theoretical part is a summary of information about the structure, biosynthesis, occurrence and biological activity of steroidal saponins and also about their determination in plant material. The work also describes the ground anchor (<i>Tribulus terrestris</i>), known for its content of steroidal saponins. The experimental part deals with the optimization of isolation, purification and quantification of selected steroidal saponins from plant material.
Keywords	Steroidal saponins, <i>Tribulus terrestris</i> , SPE, UPLC-MS/MS
Number of pages	67
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Danuše Tarkowské, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne 13. 5. 2022

.....

Chtěla bych vyjádřit poděkování své školitelce Mgr. Danuši Tarkowské, Ph. D. za vstřícné vedení a odborné rady v laboratoři i při zpracování této diplomové práce.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Dělení a struktura přírodních saponinů	12
2.2 Biosyntéza saponinů.....	14
2.3 Výskyt saponinů.....	15
2.4 Vlastnosti a biologická aktivita saponinů	27
2.5 Kotvičník zemní (<i>Tribulus terrestris</i> L.).....	29
2.6 Přehled analytických metod využívaných ke stanovení SSs.....	32
2.6.1 Konvenční metody extrakce	32
2.6.2 Zelené metody extrakce	33
2.6.3 Kvantifikace SSs.....	33
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
3.1 Chemikálie	36
3.2 Rostlinný materiál	37
3.3 Přístrojové vybavení.....	37
3.4 Použité metody.....	38
3.4.1 Optimalizace extrakce a izolace SSs	38
3.4.2 Optimalizace navážky a matriční efekt.....	40
3.4.3 Izolace a purifikace SSs z rostlinného materiálu	40
3.4.4 Vývoj a optimalizace UPLC-MS/MS metody analýzy SSs.....	41
3.4.5 UPLC-MS/MS analýza SSs	43
4 VÝSLEDKY	44
4.1 Optimalizace postupu izolace a purifikace SSs	44
4.2 Vývoj a optimalizace UPLC-MS/MS metody analýzy SSs.....	44
4.3 Stanovení SSs v rostlinném materiálu.....	49

4.3.1	Ideální navážka a matriční efekt	49
4.3.2	Stanovení SSs v kotvičníku zemním (optimalizovaná navážka 5 mg)	51
4.3.3	Stanovení SSs v kotvičníku zemním (neoptimalizovaná navážka 25 mg)	52
5	DISKUZE	53
5.1	Optimalizace metod izolace a analýzy SSs	53
5.2	Obsah SSs v rostlinném materiálu	56
6	ZÁVĚR	59
7	CITOVANÁ LITERATURA	60

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN – acetonitril

ASE – zrychlená extrakce rozpouštědlem

CE – kapilární elektroforéza

DW – suchá hmota

EAE – extrakce za pomoci enzymu

ELSD – evaporative light scattering detector

ESI – ionizace elektrosprejem

EtOH – etanol

GC – plynová chromatografie

HCT-116 – lidská buněčná linie kolorektálního karcinomu

HeLa – lidská buněčná linie cervikálního karcinomu

HepG2 – lidská buněčná linie hepatocelulárního karcinomu

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LLE – extrakce kapalina-kapalina

Lovo – lidská buněčná linie kolorektálního karcinomu

MAE – mikrovlnná extrakce

MEKC – micelární elektrokinetická chromatografie

MeOH – metanol

MEP – metylerytritol fosfát

MS – hmotnostní spektrometrie

MVA – kyselina mevalonová

PEF – extrakce v pulzním elektrickém poli

PLE – extrakce tlakovou kapalinou

rpm – otáčky za minutu

SFE – extrakce superkritickou kapalinou

SGC7901 – lidská buněčná linie karcinomu žaludku

SH-SY5Y – lidská buněčná linie neuroblastomu

SPE – extrakce na pevné fázi

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

UAE – ultrazvukem asistovaná extrakce

UPLC – ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UPLC-MS/MS – ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Saponiny tvoří početnou skupinu rostlinných sekundárních metabolitů. Lze je rozdělit na triterpenoidní a steroidní saponiny (SSs). SSs se skládají ze sapogeninové části se steroidním skeletem (aglykonu) a sacharidové části (glykonu). Podle typu struktury steroidní části je můžeme dále dělit na cholestanové, furostanové a spirostanové. Saponiny mají nepříjemnou hořkou chuť a většinou se vyskytují v bezbarvé podobě. Saponiny nalézáme v rostlinách (a to ve většině rostlinných částí), houbách, bakteriích a některých nižších mořských organismech.

Tyto sekundární metabolity představují biologicky aktivní látky. Celkově bylo prokázáno, že SSs vykazují mnoho účinků, například protinádorové, antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální či antidiabetické účinky. Pozitivně působí také na kardiovaskulární, nervový a imunitní systém. Schopností některých saponinů je působení na permeabilitu buněčných membrán, čímž dochází k hemolytické aktivitě. Mechanismus antibakteriální aktivity je založen právě na destrukci buněčné membrány (jejich účinek je tedy baktericidní). V samotných rostlinách napomáhají SSs v obraně proti řadě patogenů.

Známou rostlinou s obsahem SSs je kotvičník zemní (*Tribulus terrestris*). Tato dvouděložná bylina se žlutými květy patří do čeledi kacíbovitých. Můžeme ho najít v různých částech světa. Kotvičník dorůstá až do výšky jednoho metru a preferuje spíše vyprahlé podnebí a písčité půdy. Jeho plody jsou díky vysokému obsahu různých látek využívány v tradiční čínské a indické medicíně. Dominantní složkou je steroidní saponin protodioscin.

SSs lze z rostlinného materiálu izolovat pomocí řady metod. Metody izolace steroidních saponinů pro preparativní účely se dělí na konvenční a zelené technologie. Ke konvenčním metodám se řadí macerace, Soxhletova a refluxní extrakce. Ekologické zelené metody extrakce zahrnují mikrovlnou, ultrazvukovou a zrychlenou extrakci rozpouštědlem, extrakci v pulzním elektrickém poli, extrakci za pomoci enzymu, extrakci tlakovou kapalinou či extrakci superkritickou tekutinou. Metody izolace pro analytické účely zahrnují extrakci kapalina-kapalina (častěji využívaná) a extrakci na tuhé fázi. Metody kvantifikace saponinů se dělí na spektrofotometrické a chromatografické. Celkový obsah saponinů v extraktu bývá kvantifikován pomocí spektrofotometrie. Separace saponinů z rostlinných materiálů pomocí chromatografických metod se využívá k identifikaci a kvantifikaci konkrétního saponinu.

Cílem této práce je shrnout informace o SSs v rostlinách, o jejich struktuře, výskytu a biologické aktivitě. Také je zde uveden přehled analytických metod využívaných

pro stanovení SSs ve vzorcích biologického původu. Experimentální část je věnována zavedení metodiky pro skrínink vybraných SSs ve vzorcích rostlinné povahy. Experimenty jsou provedeny se vzorky kotvičníku zemního.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Dělení a struktura přírodních saponinů

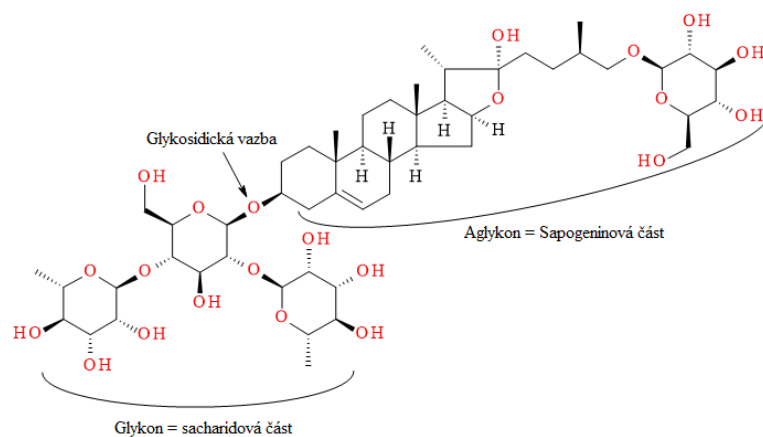
Saponiny jsou velkou skupinou rostlinných sekundárních metabolitů, kterou lze rozdělit do dvou hlavních tříd, a to na triterpenoidní saponiny (šest izoprenových jednotek – 30 uhlíků) a steroidní saponiny (27 uhlíků; Nguyen et al. 2020; Sadeghi et al. 2013) – Tab. 1.

Tab. 1 – Základní rozdělení saponinů podle jejich aglykonu na triterpenoidní a steroidní. Glykon je pak tvořen kombinací uvedených sacharidů.

	Aglykon (sapogenin)	Triterpenoidní
		Steroidní
Saponin		D-glukóza, D-galaktóza, L-ramnóza,
	Glykon (sacharid)	kyselina D-glukuronová, L-arabinóza, D-fukóza, D-xylóza

Steroidní saponiny (SSs) se dále dělí na cholestanové, furostanové a spirostanové. Saponiny mají nepříjemně hořkou chuť a většinou se vyskytují v bezbarvé podobě (Nguyen et al. 2020).

Triterpenoidní či steroidní aglykon tvoří sapogeninovou část, jež je glykosidicky spojena se sacharidovou částí (glykonem) – Obr. 1 (Rehan et al. 2020; Nguyen et al. 2020; Singh & Chaudhuri 2018). Sacharidová část bývá tvořena D-glukózou, D-galaktózou, L-ramnózou, kyselinou D-glukuronovou, L-arabinózou, D-fukózou či D-xylózou (Lorent et al. 2014). SSs obsahují jako sapogenin tetracyklické steroidní jádro a extra furanové a pyranové heterocykly (Nguyen et al. 2020). Ginsenosidy obsažené v ženšenu jsou například kvůli nedostatku těchto extra heterocyklů řazeny k triterpenoidním saponinům, ačkoliv mají steroidní strukturu. Saponiny představují amfifilní sloučeniny (látky mající současně vlastnosti hydrofilní i lipofilní), které obsahují lipofilní aglykon a hydrofilní sacharidovou část (Singh & Chaudhuri 2018).

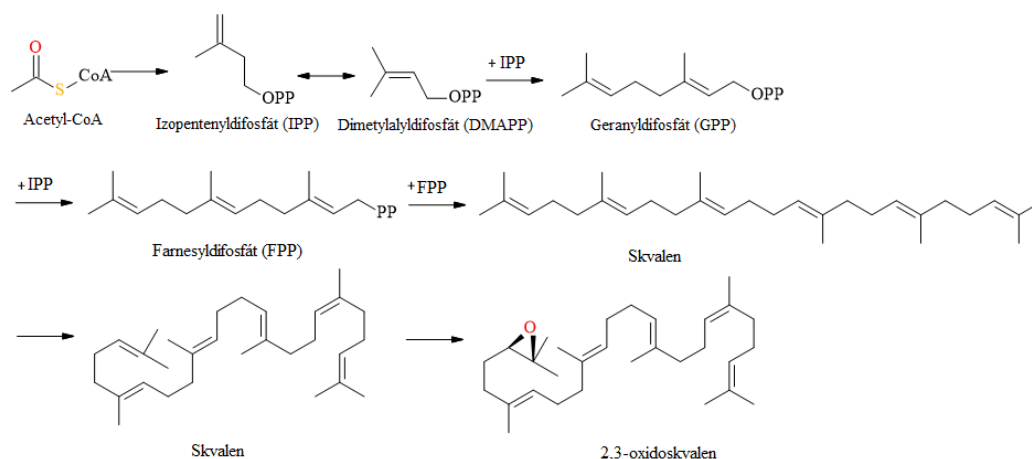


Obr. 1 – Každý saponin je tvořen sapogeninovou částí (aglykonem) a sacharidovou částí (glykonem). Tyto části jsou spojeny glykosidickou vazbou.

Saponiny jsou také rozdělovány na základě jejich odlišností v sacharidové části řetězce (Rehan et al. 2020). Podle sacharidové části se dělí na mono-, bi- a tridesmosidové. Jestliže je sacharidová jednotka připojena k sapogeninu přes C-3, jedná se o monodesmosidy (Moghimipour & Handali 2015). Pokud obsahuje saponin na C-26 a C-28 více sacharidových jednotek, nazýváme jej bidesmosidový.

2.2 Biosyntéza saponinů

Jedná se o velmi komplikovaný proces, na kterém se podílí dvě dráhy: dráha kyseliny mevalonové (MVA) a dráha metylerytritol fosfátu (MEP; (Eisenreich et al. 1998)). U vyšších rostlin probíhá biosyntéza prostřednictvím MVA i MEP dráhy. Biosyntéza saponinů začíná tvorbou izopentenyl difosfátu (IPP), který kondenzuje se svým izomerem dimetylallyldifosfátem (DMAPP) za vzniku geranyldifosfátu (GPP) (Dubey et al. 2003). GPP dále kondenzuje s IPP a vytváří tak seskviterpenoidní farnesyldifosfát (FPP). Dvě jednotky FPP kondenzují za účasti enzymu skvalen syntázy a vzniká lineární skvalen, který se pomocí skvalen epoxigenázy oxiduje na 2,3-oxidoskvalen (Obr. 2). Oxidoskvalen je cyklizován množstvím oxidoskvalen cykláz, což je první krok v biosyntéze jak steroidních, tak i triterpenoidních saponinů a fytosterolů (Rehan et al. 2020; Abe et al. 1993).



Obr. 2 – Schéma biosyntézy SSs. Kondenzací IPP s izomerem DMAPP nejprve vzniká GPP, ke kterému se dále připojí další jednotka IPP. Dvě jednotky nově vzniklého FPP spolu kondenzují a vytváří tak lineární skvalen, jenž se postupně cyklizuje a oxiduje na 2,3-oxidoskvalen.

Cyklizace poskytuje mnoho produktů (Rehan et al. 2020). Jedním z nich je cykloartenol, z něhož vzniká cholesterol (C_{27}), kampesterol (C_{28}) či sitosterol (C_{29}). SSs pak vznikají prostřednictvím glykosylací a oxygenací původního cholesterolu (Ginzberg et al. 2009).

2.3 Výskyt saponinů

Saponiny nalézáme v rostlinách, houbách, bakteriích a některých nižších mořských organismech (Marrelli et al. 2016; Gafni et al. 1997; Osbourn et al. 2011). Přirozeně se vyskytují ve většině rostlinných částí, jako jsou listy, kořeny, kůra, stonky, květy, plody a oddenky (Rehan et al. 2020). Častěji se však vyskytují v listech a kořenech (Nguyen et al. 2020). Obvykle jsou saponiny zastoupeny u dvouděložných i jednoděložných rostlin. SSs se vyskytují převážně v zástupcích jednoděložných rostlin (Netala et al. 2014).

Triterpenoidní saponiny byly objeveny například v sójových bobech, fazolích, hrachu, čaji, špenátu, cukrové řepě či v citrusech (Nguyen et al. 2020). SSs se vyskytují v semenech rajčat, chřestu, lilku nebo ovsu. Bylo také zaznamenáno, že nejspíš obiloviny a traviny obsahují celkově méně saponinů (De Geyter et al. 2007).

Jednou z nejprostudovanějších rostlin z pohledu saponinů je ženšen (*Panax ginseng*; Obr. 3) kvůli jeho mnohým farmakologickým účinkům (Scott et al. 2001; Shi et al. 2011). Bylo prokázáno, že přítomné saponiny jsou přímo zodpovědné za jeho kardioprotektivní účinky.



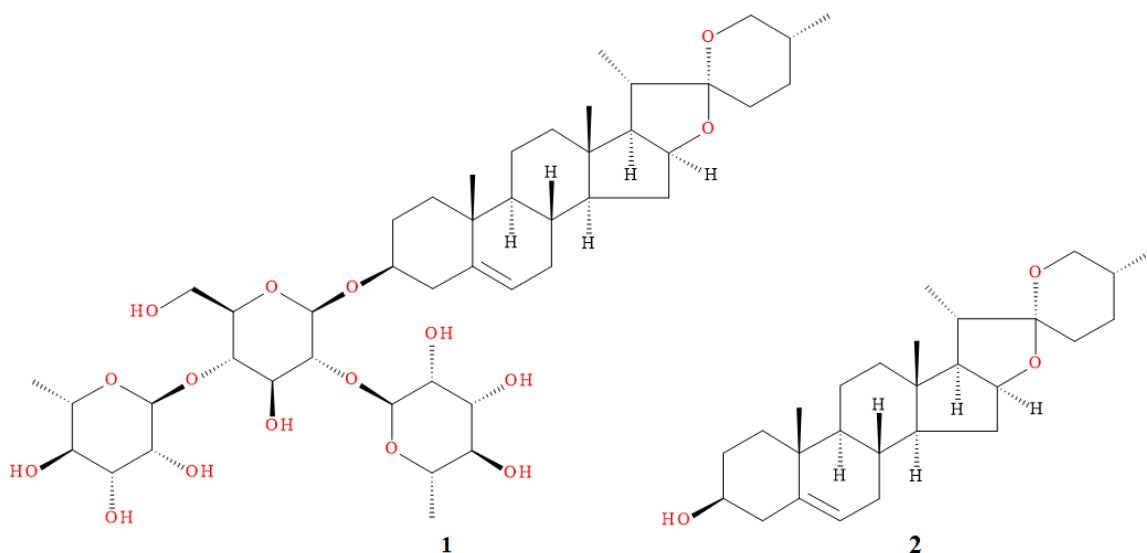
Obr. 3 – Ženšen pravý (*Panax ginseng*; staženo 13. 8. 2021 z <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ginsengpflanze.jpg>).

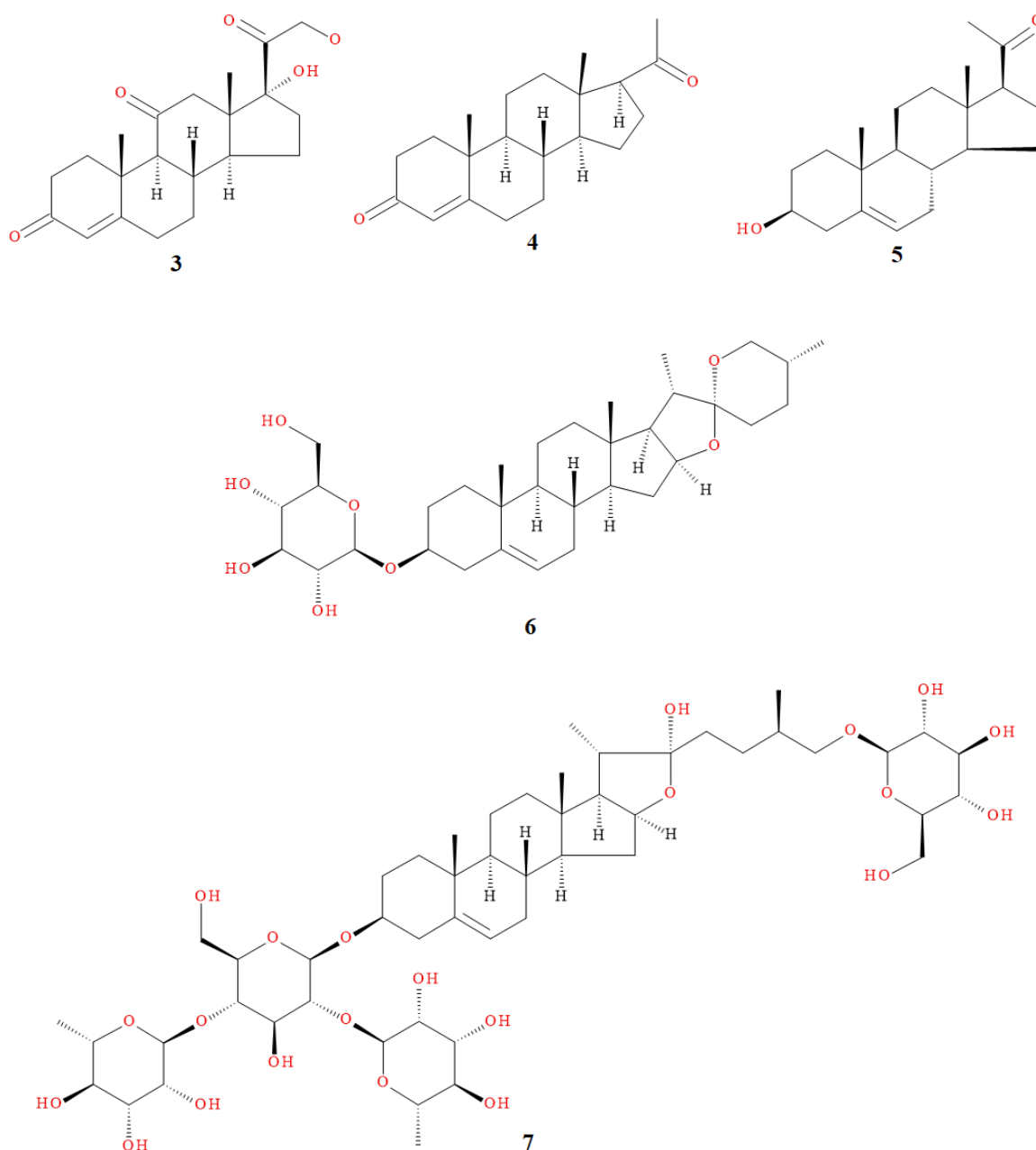
Na biologicky aktivní složky typu SSs jsou rovněž bohaté rostliny rodu *Dioscorea* (Wang et al. 2012). V hlízách *Dioscorea villosa* a *Dioscorea nipponica* (Obr. 4) se hojně vyskytuje sapogenin dioscin (1). Jeho hydrolýzou se získává steroidní aglykon diosgenin (2) sloužící k syntéze dalších steroidů, jako je kortizon (3), progesteron (4) nebo pregnenolon (5) (Patel

et al. 2012; Peng et al. 2011) – Obr. 5. V *Dioscorea nipponica* jsou pak obsaženy ještě trillin (6) a protodioscin (7) (Wang et al. 2012) – Obr. 5. Dalšími rostlinnými čeleděmi bohatými na SSs jsou Agavaceae, Alliaceae, Asparagaceae, Dioscoreaceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Bromeliaceae, Palmae a Scrophulariaceae (Moses et al. 2014).



Obr. 4 – *Dioscorea nipponica* (staženo 13. 8. 2021 z <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id950953/>).

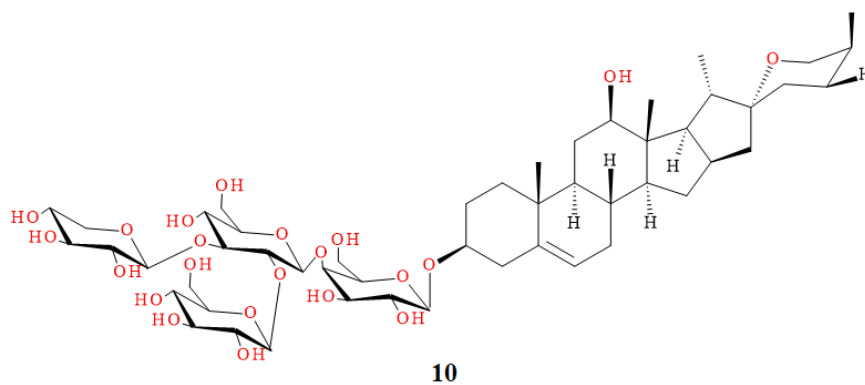
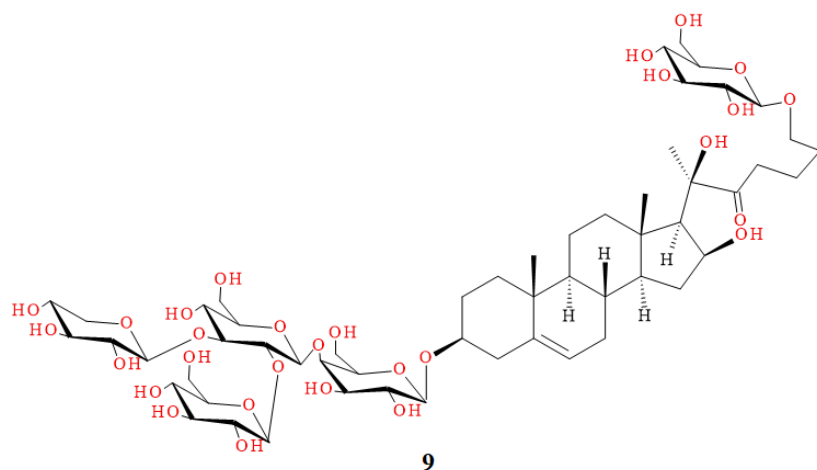
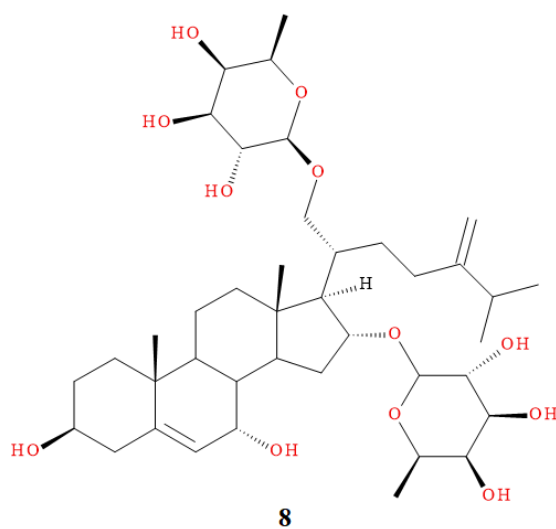


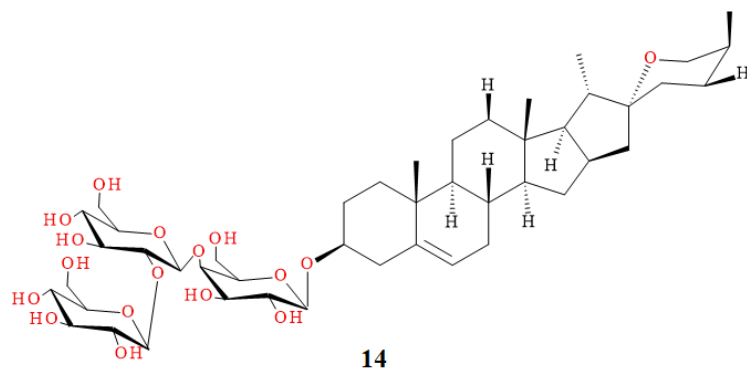
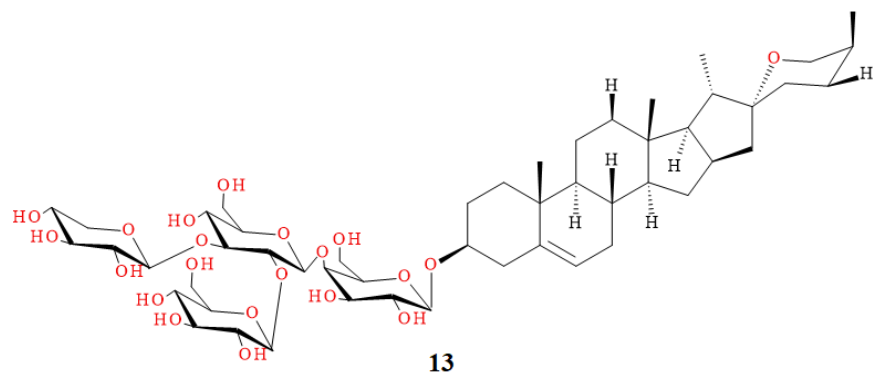
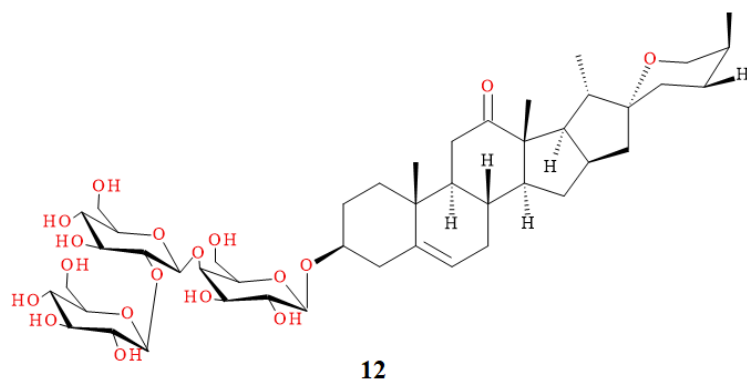
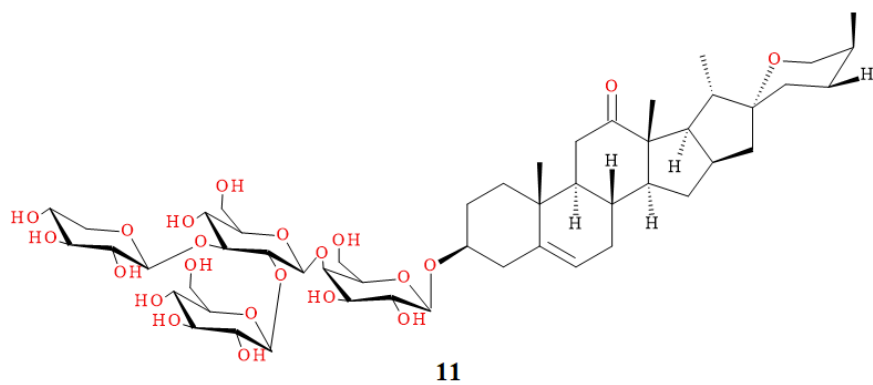


Obr. 5 – *Struktury steroidních saponinů obsažených v rostlinách rodu Dioscorea: dioscin (1), diosgenin (2), kortizon (3), progesteron (4), pregnenolon (5), trillin (6) a protodioscin (7).*

Většina rostlin syntetizuje saponiny v průběhu fyziologického vývoje (Moses et al. 2014). Složení a množství jednotlivých saponinů se během růstu liší jak mezi rostlinnými druhy, tak i mezi jednotlivými rostlinami téhož druhu, orgány a pletivy. Obsah saponinů je ovlivněn i sezónními výkyvy. Rozdíly ve tvorbě saponinů mohou odpovídat stupni potřebné ochrany rostliny. U některých druhů dochází k produkci saponinů až v reakci na stres.

V poslední době bylo objeveno několik nových SSs. V etanolovém extraktu hvězdice *Choriaster* byl zaznamenán granulatosid C (**8**) (Ivanchina et al. 2017). V oddencích *Aspidistra typica* byly objeveny nové furostanolové a spirostanolové typaspidosidy (typaspidosid B – **9**), z nichž některé vykazovaly anti-HIV aktivitu prostřednictvím inhibice virové replikace (Cui et al. 2016). Spolu s nimi byly izolované i již známé spirostanolové saponiny atropurosíd (atropurosíd H – **10**), neoaspidistrin (**11**), pratioxid (pratioxid D1 – **12**), aspidistrin (**13**) a neosibiricosid (neosibiricosid D – **14**).





Obr. 6 – *Struktury steroidných saponinů objevených v Choriaster: granulatosid C (8) a Aspidistra typica: typaspidosid B (9), atropurosid H (10), neoaspidistrin (11), pratioxid D1 (12), aspidistrin (13) a neosibiricosid D (14).*

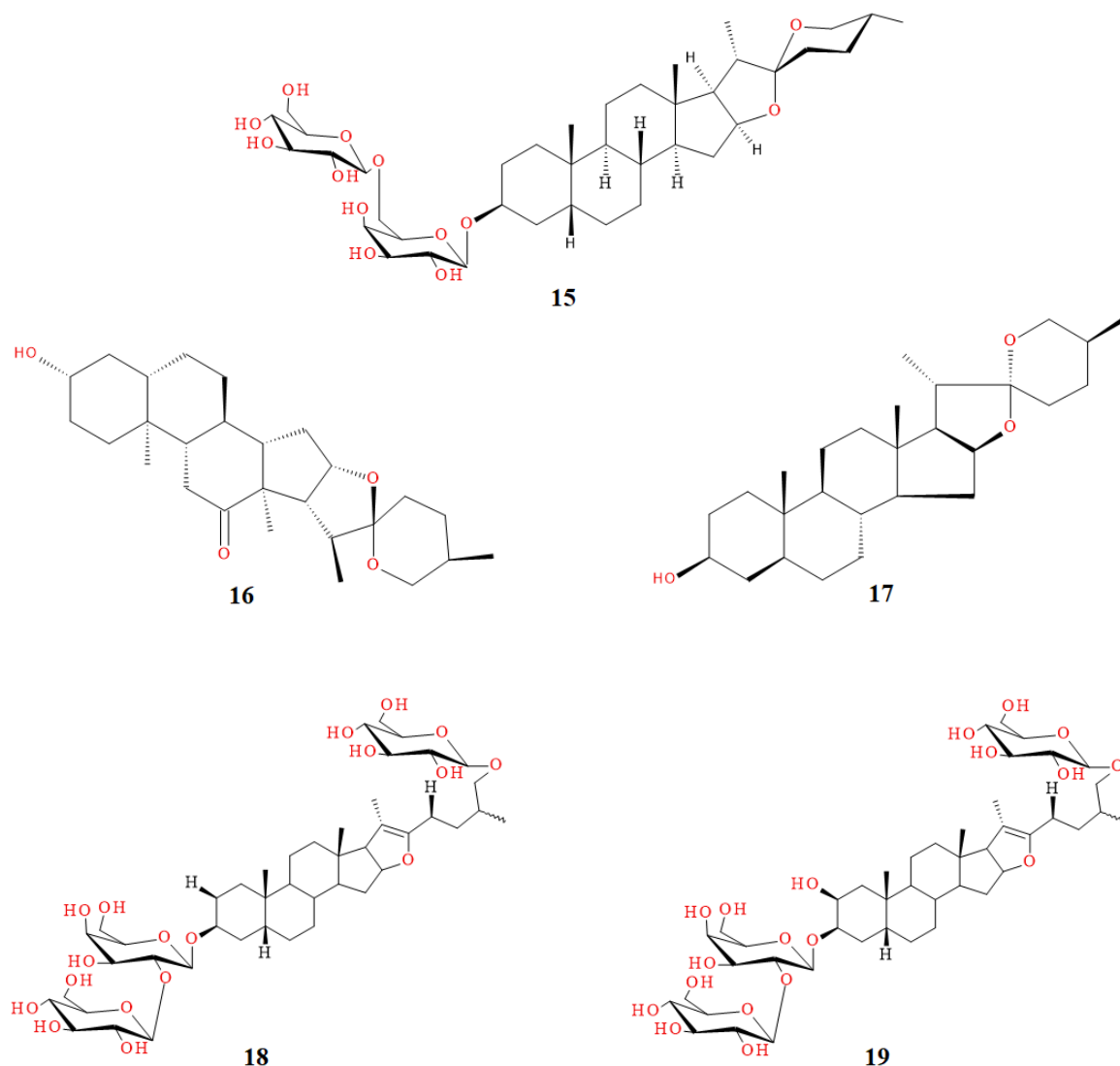
V roce 2016 byly extrahovány fyto toxické furcrosidy (furcrosid D – **15**) z listů sukulentní tropické rostliny *Furcraea hexapetala* (Obr. 7), který je blízkým příbuzným agáve (Calle et al. 2016). V této rostlině byly také zaznamenány známé a významné saponiny hecogenin (**16**) a tigogenin (**17**). Oddenky *Anemarrhena asphodeloides* (Obr. 8) obsahují anemarsaponiny (anemarsaponin B – **18**) a timosaponiny (timosaponin D – **19**) (Yang et al. 2016). Některé z nich vykazují cytotoxickou aktivitu proti lidským rakovinným buněčným liniím HepG2 a SGC7901.



Obr. 7 – *Furcraea hexapetala* (staženo 13. 8. 2021 z https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Furcraea_hexapetala_SSZ.jpg).



Obr. 8 – *Anemarrhena asphodeloides* (staženo 13. 8. 2021 z https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Anemarrhena_asphodeloides_RBG_Kew.jpg).

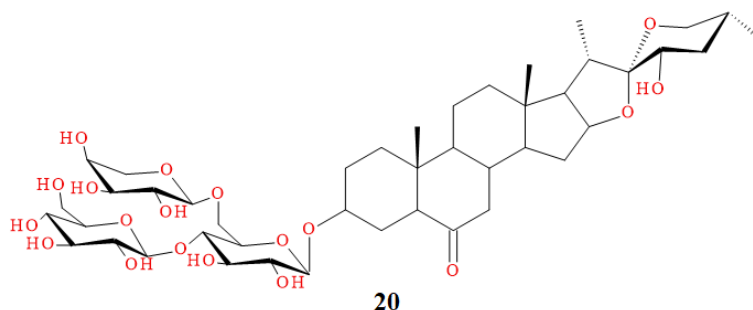


Obr. 9 – Struktury steroidních saponinů získaných z *Furcraea hexapetala*: furcrosid D (15), hecogenin (16), tigogenin (17) a z *Anemarrhena asphodeloides*: anemarsaponin B (18), timosaponin D (19).

Nové SSs byly objeveny dále v sušených kořenech a oddencích *Helleborus thibetanus* (Zhang et al. 2016) a v etanolvém extraktu oddenku *Polygonatum sibiricum* (Tang et al. 2019) – obr. 10. Cytotoxické smilscobinosidy (smilscobinosid C – 20) pochází z oddenků *Smilax scobinicaulis* (Shu et al. 2017). Jejich cytotoxicita byla testována na čtyřech lidských nádorových buněčných liniích (SH-SY5Y, SGC-7901, HCT-116 a Lovo). V kotvičníku zemním (*Tribulus terrestris*), známé jednoleté léčivé bylině z čeledi kacíbových (viz kapitola 2.5 níže), jsou syntetizovány furostanolové i spirostanolové terrestriny (Wang et al. 2016).



Obr. 10 – *Helleborus thibetanus* (vlevo; staženo 13. 8. 2021 z [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Helleborus_thibetanus_'Sichuan_-200301'_Franch.,_Nouv._Arch._Mus._Hist._Nat._sér._2,_8_196_\(1886\)_\(49643700751\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Helleborus_thibetanus_'Sichuan_-200301'_Franch.,_Nouv._Arch._Mus._Hist._Nat._sér._2,_8_196_(1886)_(49643700751).jpg)) a *Polygonatum sibiricum* (vpravo; staženo 13. 8. 2021 z https://www.researchgate.net/figure/Polygonatum-sibiricum-Redoute-Photo-by-IHan_fig3_281397263).

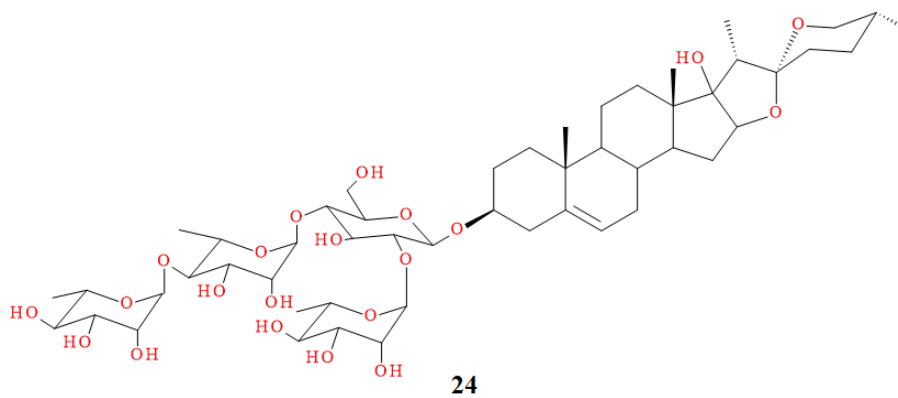
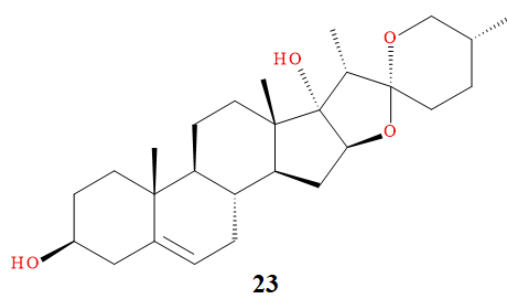
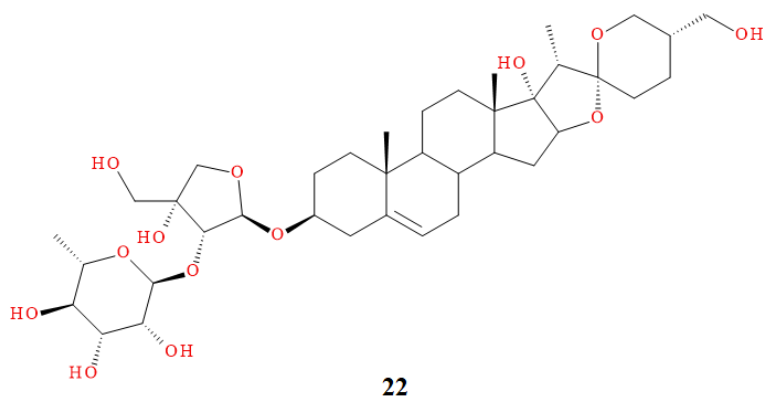
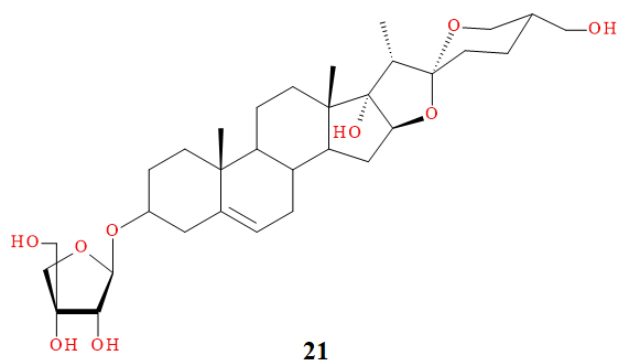


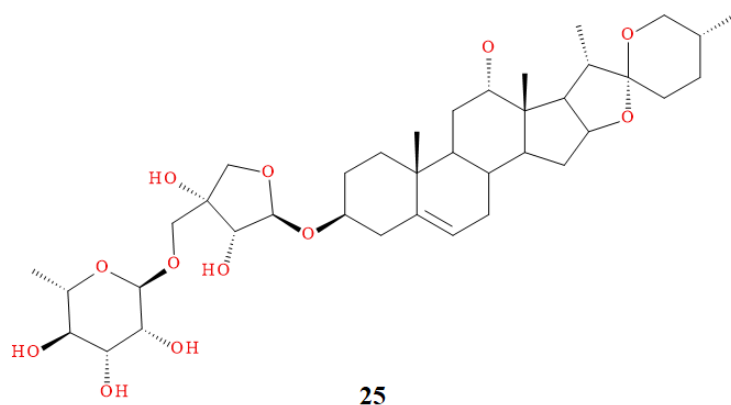
Obr. 11 – Zástupce steroidních saponinů z oddenků rostliny *Smilax scobinicaulis*: smilscobinosid C (**20**).

Další rostlinou, která obsahuje spirostanolové i furostanolové saponiny, je jihoasijská *Tupistra chinensis* (Song et al. 2015; Xiang et al. 2016a; Xiang et al. 2016b). Tyto látky vykazují antiproliferativní a protizánětlivou aktivitu.

K novým SSs spirostanolového typu se řadí saponiny získané z rostliny *Ypsilandra parviflora* pojmenované jako ypsiparosidy (ypsiparosid A – **21**) (Lu et al. 2017). Ypsiparosidy byly hodnoceny na schopnost indukovat agregaci trombocytů, což odpovídá hemostatickému účinku této rostliny. K již dříve objeveným saponinům této rostliny patří

ypsilandrosidy (ypsilandrosid C – **22**), pennogenin (**23**), paris saponiny (paris saponin VII – **24**), taccasubosid B (**25**) a další.



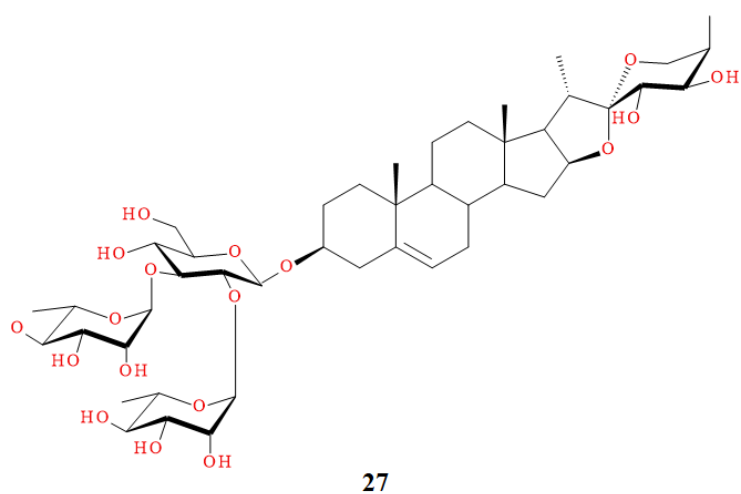
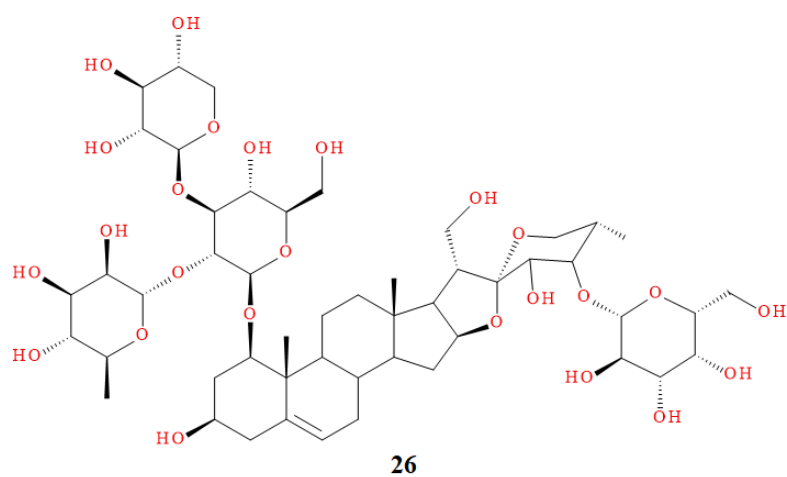


Obr. 12 – Struktury nových a již dříve známých steroidních saponinů rostliny *Ypsilandra parviflora*: ysiparosid A (21), ysilandrosid (22), pennogenin (23), paris saponin VII (24), taccasubosid B (25).

Z *Paris polyphylla* var. *Stenophylla* (Obr. 13) byly izolovány paristenosidy (paristenosid A – 26) a známé paris saponiny (24) (Jin et al. 2016). V oddencích *Tacca vietnamensis* se vyskytují taccavietnamosidy (taccavietnamosid C – 27) s protizánětlivou aktivitou (Yen et al. 2016).



Obr. 13 – *Paris polyphylla* (staženo 13. 8. 2021 z https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Paris_polyphylla_PICT6030.jpg).



Obr. 14 – Struktury izolovaných steroidních saponinů z *Paris polyphylla*: paristenosid A (26) a z *Tacca vietnamensis*: taccavietnamosid C (27).

SSs furostanolového typu byly objeveny v *Dendrobium chrysanthum* (Yang et al. 2019) – obr. 15. Tyto saponiny jsou také biologicky aktivní a mají cytotoxickou aktivitu např. proti HeLa lidským nádorovým buněčným liniím.



Obr. 15 – *Dendrobium chrysanthum* (staženo 13. 8. 2021 z <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id966877/>).

2.4 Vlastnosti a biologická aktivita saponinů

Saponiny jsou různě rozpustné v závislosti na použitém rozpouštědle, teplotě či pH (Nguyen et al. 2020). Vysoce rozpustné jsou například ve vodě, metanolu, etanolu a jiných organických rozpouštědlech, které se také používají pro jejich extrakci.

Jelikož se jedná o amfifilní sloučeniny, působí ve vodném roztoku jako povrchově aktivní látky, tenzidy (Nguyen et al. 2020). Saponiny se svou lipofilní částí uspořádávají mimo vodný roztok, což vede ke snížení povrchového napětí a vzniku pěny.

Další schopností saponinů je působení na permeabilitu buněčných membrán, což způsobuje jejich hemolytickou aktivitu (Nguyen et al. 2020). Krvinky jsou tímto způsobem jednoduše poškozeny, protože neobsahují jádro, a tudíž nejsou schopny membránu opravit. Hemolytická aktivita se však nevyskytuje u všech saponinů.

V minulosti byly saponiny považovány za látky s antinutriční hodnotou (Nguyen et al. 2020). Současné studie však ukázaly, že vykazují mnoho aktivit. Mají například protinádorové, antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální, antidiabetické a neuroprotektivní účinky. Pozitivně působí také na kardiovaskulární a imunitní systém.

Kardioprotektivní vlastnosti jednotlivých saponinů fungují na různých mechanismech, jako jsou antioxidační a antihypoxický efekt, regulace Ca^{2+} iontů, vazodilatační účinky, angiogeneze, apoptóza kardiocytů, antitrombotické účinky a mnoho dalších (Singh & Chaudhuri 2018). Diosgenin (2) a jeho deriváty jsou známými kardioprotektivními látkami se schopností snižovat hladinu sérového cholesterolu zabráněním jeho absorpce ve střevech (Genser et al. 2012). Další přírodní steroidní saponin trillin z oddenků *Dioscorea nipponica* potlačuje peroxidaci lipidů a zvyšuje aktivitu superoxid dismutázy (SOD), která se podílí na antioxidační ochraně buněk (Wang et al. 2012).

Saponiny jsou také užitečné u pacientů s diabetem mellitus, kdy jsou schopny obnovit inzulínovou odpověď, zvýšit plazmatické hladiny inzulínu a vyvolat jeho uvolňování ze slinivky břišní (Marrelli et al. 2016).

Saponiny jsou při orálním příjmu hodnoceny jako netoxické, jelikož dochází pouze k nízkému podílu absorpce, což je způsobeno jejich vysokou molekulovou hmotností a špatnou prostupností membránami (Nguyen et al. 2020; Singh & Chaudhuri 2018). Saponiny ani nepřechází do krve a jsou hydrolyzovány střevní mikroflórou na sapogeniny a sacharidy. Tato skutečnost omezuje využití saponinů jako léčiv. Jestliže jsou saponiny zavedeny intravenózně, působí toxicky kvůli své hemolytické aktivitě.

V samotných rostlinách nejsou saponiny vyžadovány pro normální růst rostlin, jejich vývoj či reprodukci, ale napomáhají rostlinám v obraně proti patogenům a škůdcům svými antimikrobiálními, antifungálními, antiparazitními, insekticidními a antifidantními vlastnostmi (Chaieb 2010). Dále jsou rostlinami uvolňovány do půdy za účelem potlačení růstu jiných rostlin (alelopatické účinky), aby tak zabránily konkurenci o zdroje výživy (Moses et al. 2014).

Průmyslově se tato skupina rostlinných metabolitů využívá jako emulgátory či detergenty (Nguyen et al. 2020). Pro svou antimikrobiální vlastnost nalézají uplatnění také v šampónech a zubních pastách. Prvně byly saponiny využity v roce 1960 k syntéze pohlavního hormonu progesteronu z diosgeninu (2; odvozený od dioscinu – 1) pro účely perorální antikoncepce (Balandrin 1996).

2.5 Kotvičník zemní (*Tribulus terrestris* L.)

Kotvičník zemní (*Tribulus terrestris* L.; Obr. 16) je dvouděložná rostlina patřící do čeledi kacíbových (Zygophyllaceae), jež zahrnuje asi 25 rodů a 250 druhů (Ștefănescu et al. 2020; Dinchev et al. 2008). Tato jednoletá plazivá bylina se žlutými květy se vyskytuje téměř po celém světě, především ale v Číně, Jižní Africe, Austrálii, Indii a Evropě. Kotvičník může dorůst až do výšky jednoho metru a preferuje spíše vyprahlé podnebí a písčité půdy. Jeho plody jsou díky vysokému obsahu různých látek využívány v tradiční čínské, indické i bulharské medicíně (Pokrywka et al. 2014).



Obr. 16 – Kotvičník zemní (*Tribulus terrestris*; staženo 19. 8. 2021 z <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id3549/>).

V extraktu kotvičníku zemního bylo identifikováno přes 70 strukturně odlišných sekundárních metabolitů s různými biologickými aktivitami (Ștefănescu et al. 2020). Tato rostlina obsahuje zejména SSs, flavonoidy, trísloviny, terpenoidy, polyfenolické sloučeniny či alkaloidy. Přítomné SSs jsou převážně furostanové a spirostanové (protodioscin, dioscin, diosgenin, tribulosin, terrestrininy, hecogenin a další). Dominantní složkou plodů je bioaktivní steroidní saponin furastonového typu protodioscin (7) (Dinchev et al. 2008). Složení extraktu a koncentrace jednotlivých sloučenin závisí na mnoha faktorech – např. na použité extrakční metodě, na druhu použitého rostlinného materiálu – kořeny, listy nebo plody (Ștefănescu et al. 2020). Dále obsah i koncentrace látek v kotvičníku závisí na podmínkách růstu a období sklizně, což následně ovlivňuje také samotnou biologickou aktivitu (Dinchev et al. 2008). Nejvyšší množství saponinů bylo

zaznamenáno v období před a během kvetení. Další výzkumy ukázaly, že je obsah sekundárních metabolitů spojen i s klimatickými podmínkami, ve kterých rostlina žije (Dinchev et al. 2008; Lazarova et al. 2014). Bylo však prokázáno, že i mezi extrakty rostlin ze stejné země existují rozdíly (Lazarova et al. 2014). V extraktech kotvičníků z různých částí Bulharska byla hodnocena přítomnost a koncentrace dioscinu (**1**). Dioscin (**1**) nebyl v některých extraktech vůbec detekován, a i koncentrace dioscinu (**1**), které detekovány byly, se velmi lišily. Rozdílné složení metabolitů pozorujeme také mezi jednotlivými rostlinnými orgány (Dinchev et al. 2008). Celkový obsah saponinů byl nejvyšší v listech, zatímco ve stoncích a plodech bylo množství saponinů nižší. Všechny tyto faktory působící rozdíly v obsahu sekundárních metabolitů mezi rostlinami kotvičnicku zemního vysvětlují různé farmakologické účinky v provedených studiích (Ștefănescu et al. 2020).

Kotvičnick zemní je využíván k přípravě různých farmaceutických přípravků a bylinných doplňků, které obsahují především standardizované extrakty se steroidními saponiny (Ștefănescu et al. 2020). Tyto přípravky bývají doporučovány u poruch libida u mužů i u žen, u erektilní dysfunkce, u neplodnosti či impotence, ačkoliv je jejich účinnost kontroverzní (Pokrywka et al. 2014). V poslední době je pozorována zvýšená spotřeba doplňků z kotvičnicku u sportovců, jako alternativa zakázaných anabolických steroidů, za účelem zvýšení jejich výkonu (Ștefănescu et al. 2020; Pokrywka et al. 2014).

Mezi farmakologické vlastnosti kotvičnicku zemního patří antioxidační, antibakteriální a protizánětlivá aktivita, léčba sexuálních poruch nebo antihyperglykemický účinek (Ștefănescu et al. 2020). Působí také na centrální nervový systém.

Antibakteriální vlastnosti proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím byly odhaleny v celkových i frakcionovaných extraktech (Soleimanpour et al. 2015; Batoei et al. 2016). Citlivé grampozitivní bakterie představovaly především fakultativně anaerobní kmeny, jako je *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces viscosus* nebo *Enterococcus faecalis*. K senzitivním gramnegativním bakteriím patří např. *Escherichia coli*. Při hodnocení antibakteriální aktivity proti *Escherichia coli* obsahoval metanolový extrakt kotvičnicku 54 % saponinů (Batoei et al. 2016). Není jisté, které ze sekundárních metabolitů zodpovídají za antibakteriální aktivitu (Ștefănescu et al. 2020). Právě saponiny jsou již známými antibakteriálními sloučeninami, jejichž mechanismus účinku je založen na destrukci buněčné membrány, což vede k buněčné smrti (Ștefănescu et al. 2020; Böttger et al. 2012). Jejich účinek je tedy baktericidní. Bylo také objeveno, že saponiny mohou modulovat iontové kanály, což vede ke změnám membránového potenciálu.

Extrakty kotvičníku zemního inhibují *in vitro* aktivitu α -glukosidázy, α -amylázy a lipázy, což jsou enzymy účastníci se hydrolýzy sacharidů a lipidů (Ștefănescu et al. 2020; Ercan & El 2016). α -amyláza štěpí oligosacharidy na disacharidy a α -glukosidáza disacharidy na glukózu a ostatní monosacharidy. Inhibicí aktivity těchto dvou enzymů dochází ke snížení postprandiální hyperglykémie u diabetiků. Lipáza zodpovídá za štěpení triacylglycerolů na monoacylglyceroly a volné mastné kyseliny. Aktivita celkového extraktu byla vyšší než aktivita samotných saponinů, což značí jejich synergické působení s dalšími složkami kotvičníku.

Extrakty kotvičníku byly také *in vitro* hodnoceny z hlediska toxikologických efektů (Abudayyak et al. 2014). Bylo zjištěno, že vykazují estrogení a genotoxické účinky. Proto by užívání kotvičníku mělo být pečlivě uvážené, aby nedošlo k frameshift mutacím či narušení endokrinního systému.

2.6 Přehled analytických metod využívaných ke stanovení SSs

SSs lze z rostlinných materiálů izolovat pomocí běžných organických rozpouštědel, jako je etanol, metanol, aceton a další (Nguyen et al. 2020). Samotná extrakce se pak může dělit na konvenční a novější zelené technologie (Heng et al. 2013; Nguyen et al. 2020; Azmir et al. 2013; Nguyen et al. 2020). Princip konvenčních metod spočívá v rozpuštění rozpustné látky z rostlinného materiálu v rozpouštědle, což vyžaduje větší množství rozpouštědla. Někdy je rozpouštění látky podpořeno zahříváním nebo mechanickým mícháním a třepáním. Tyto metody jsou také časově náročnější. Výhody ekologičtějších zelených metod extrakce spočívají ve využívání bezpečnějších chemikálií a obnovitelných surovin, jejich energetické účinnosti či v prevenci znečištění (Azmir et al. 2013). Jako extrakční rozpouštědlo se využívá voda při různém tlaku a teplotě.

V několika pracích bylo k extrahování SSs a jejich purifikaci využito také extrakce kapalina-kapalina – LLE (Fang et al. 1999) či extrakce na tuhé fázi – SPE (Dinchev et al. 2008). LLE spočívá v přenosu cílového analytu z jedné kapalné fáze do druhé nemísitelné kapalné fáze podle rozpustnosti analytů v těchto fázích (Chen et al. 2008). SSs byly takto rozděleny například mezi vodu a *n*-butanol (Fang et al. 1999). Při SPE jsou rozpuštěné analyty přivedeny do kontaktu s pevnou fází v kolonce, kde jsou pak tyto analyty důsledkem interakcí se sorbentem zadržovány (Kraševac & Prosen 2018). K extrakci SSs byla například využita kolonka C-18 Sep-Pak s elucí analytů pomocí 70% etanolu (Dinchev et al. 2008).

2.6.1 Konvenční metody extrakce

Ke konvenčním metodám se řadí macerace, Soxhletova a refluxní extrakce. Macerace spočívá v extrakci pevná látka-kapalina (Takeuchi et al. 2009). Rostlinný materiál s analytem se namáčí v rozpouštědle po určitou dobu, čímž dochází k extrakci. Využívanými rozpouštědly jsou etanol a metanol (Cheok et al. 2014). Doba macerace je dlouhá, někdy až týdny. Ke zkrácení doby macerace dochází při extrahování pomocí mechanické třepačky (Lee et al. 2009) nebo magnetického míchání (Verza et al. 2012).

Soxhletova a refluxní extrakce fungují na podobném principu destilace, kdy dochází k zahřátí vzorku k varu a k následnému navracení zkondenzovaných par (Bart 2011). Jediným rozdílem mezi těmito extrakčními metodami je, že se aparát k Soxhletově extrakci skládá z náprstku pro uložení rostlinného materiálu (Cheok et al. 2014). Nevýhodou obou technik je časová náročnost (alespoň jedna hodina).

2.6.2 Zelené metody extrakce

Zelené metody zahrnují mikrovlnnou extrakci (MAE), ultrazvukem asistovanou extrakci (UAE) a zrychlenou extrakci rozpouštědlem (ASE), dále extrakci v pulzním elektrickém poli (PEF), extrakci za pomoci enzymu (EAE), extrakci tlakovou kapalinou (PLE) či extrakci superkritickou tekutinou (SFE). UAE využívá ultrazvuk, jenž představuje vlnění o frekvenci 20 kHz až 100 MHz (Azmir et al. 2013). Ultrazvukové vlny způsobují v biologickém materiálu kavitaci, která způsobuje denaturaci stěn rostlinných buněk, což zlepšuje pronikání rozpouštědla a následné uvolňování intracelulárních produktů (Mason et al. 1996). Mechanické působení ultrazvuku tak vede k vyšším výtěžkům sloučenin (Cheok et al. 2014).

MAE je založena na využití neionizujícího elektromagnetického vlnění s rozsahem frekvencí od 0,3 do 300 GHz (Heng et al. 2013; Takeuchi et al. 2009). Mikrovlny pronikají do materiálu a interagují tam s polárními složkami, což vede k zahřívání, které je potřebné k extrakci (Heng et al. 2013; Chan et al. 2011). V poslední době je populárnější díky kratší době extrakce, malému množství použitého rozpouštědla a speciálnímu zahřívacímu mechanismu (Heng et al. 2013). Účinnost této nekonvenční metody nezávisí pouze na frekvenci mikrovln a době jejich působení, ale také na použitém rozpouštědle, tlaku a teplotě při extrakci (Teo et al. 2008; Teo et al. 2009).

ASE probíhá při zvýšené teplotě a tlaku s minimálním využitím rozpouštědla. Vyšší teplota podporuje rozpustnost analytu v rozpouštědle a vyšší tlak slouží k udržení teploty rozpouštědla pod bodem varu. Jedná se tedy o rychlou, účinnou a také bezpečnou extrakci z rostlinných materiálů (Mottaleb & Sarker 2012). Metoda je nenáročná i časově (trvá asi 15 až 25 minut), proto se široce využívá v potravinářství či farmacii.

Tlak a teplota superkritické tekutiny při SFE se pohybují nad kritickými hodnotami. Svými vlastnostmi je na rozhraní plynu a kapaliny (Pereira & Meireles 2010; Sovová & Stateva 2011). Nejčastěji se využívá oxid uhličitý, který je netoxický, nehořlavý, levný a dostupný. Jeho kritický bod ($t_c = 31,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p_c = 7,37\text{ MPa}$) dovoluje extrakci i tepelně labilních sloučenin.

2.6.3 Kvantifikace SSs

Metody kvantifikace saponinů se dělí na spektrofotometrické a chromatografické (Nguyen et al. 2020). Celkový obsah saponinů v extraktu je obvykle kvantifikován pomocí spektrofotometrie. Jedná se o jednoduchou, rychlou a levnou kvantifikaci (Cheok et al. 2014). Nejčastěji se využívá test s vanilinem a kyselinou sírovou, jenž spočívá v reakci

oxidovaných triterpenoidních saponinů s vanilinem (Li et al. 2010). Oxidačním činidlem je kyselina sírová a výsledná barva reakce je fialová (Hiai et al. 1976). Proto se ke stanovení volí nejčastěji vlnová délka 544 nm (Cheok et al. 2014). Někdy se jako oxidant využívá kyselina chloristá (Chen et al. 2007; Li et al. 2010; Wu et al. 2001). Dalším často využívaným testem je test hemolytický (Nguyen et al. 2020; Barve et al. 2010). Ten je založen na reakci saponinů s krevním činidlem, přičemž dochází k uvolnění oxyhemoglobinu. Následuje spektrofotometrické měření intenzity vzniklého zbarvení.

Separace saponinů z rostlinných materiálů pomocí chromatografických metod se ve studiích využívá zejména k identifikaci a kvantifikaci konkrétní sloučeniny (Adão et al. 2011; Nguyen et al. 2020; Mostafa et al. 2013) a zkoumání jejích farmaceutických vlastností (He et al. 2012). Saponin je rozdělován mezi mobilní a stacionární fázi (Nguyen et al. 2020). Různé sloučeniny putují chromatografickým systémem různou rychlostí v závislosti na své afinitě ke stacionární fázi. Běžně se využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) (He et al. 2012; Mostafa et al. 2013; Liu et al. 2012) a k ověření přítomnosti saponinů v určitém extraktu pak chromatografie na tenké vrstvě – TLC (Adão et al. 2011; Liu et al. 2012; Nguyen et al. 2020). Vzhledem k chemické povaze saponinů je HPLC nejčastěji volenou chromatografickou technikou pro jejich stanovení (Oleszek & Bialy 2006; Oleszek 2002). HPLC je široce používána pro stanovení jak aglykonů, tak intaktních saponinů (Oleszek 2002). Separace se obvykle provádějí pomocí kolon na normálních (silikagel) a reverzních fázích (C8, C18). Kolona C18 bývá preferována, ale někdy se využívají i jiné modifikované silikagelové nosiče. Ke kvantifikaci saponinů byla použita také modernější a účinnější verze LC, a to ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie – UPLC (Foubert et al. 2010; Ha et al. 2014). Pro detekci separovaných látek se používá buď destruktivní ELSD (Ganzera et al. 2001), UV detekce nebo nejčastěji detekce pomocí hmotnostní spektrometrie – MS (Fang et al. 1999; Mulinacci et al. 2003; Dinchev et al. 2008).

Další chromatografická technika plynová chromatografie (GC) se v rámci analýzy SSs příliš nepoužívá, jelikož se jedná o relativně polární a velké netěkavé molekuly, které by bylo případně potřeba derivatizovat (Oleszek 2002). Tato metoda má význam spíše při separaci aglykonové části. GC ve spojení s MS byla v tomto smyslu použita např. ke stanovení hecogeninu (**16**) a tigogeninu (**17**) v kotvičníku, z něhož byly zmíněné zájmové látky izolovány mikrovlnou extrakcí (Li et al. 2009).

Pro separaci SSs se kromě chromatografických metod osvědčila rovněž kapilární elektroforéza – CE (Oleszek 2002). Metoda nabízí mnohem vyšší účinnosti separace

(dosažení miliónů teoretických pater) ve srovnání s HPLC. Nicméně nemožnost dosáhnout dostatečně nízkých detekčních limitů tuto metodu bohužel odsouvá do pozadí. Nejúspěšněji byla použita při separaci saponinů přítomných v ženšenu, a to v módu micelární elektrokinetické chromatografie MEKC při použití dodecyl síranu sodného (SDS) a UV detekce při 200 nm (Iwagami et al. 1992).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Acetonitril (Merck KGaA, Německo)

Etanol (Merck KGaA, Německo)

Kyselina mravenčí (98%; Sigma-Aldrich, Německo)

Metanol (Merck KGaA, Německo)

Standardy:

β -sitosterol- β -D-glukosid (sit-glu; Toronto Research Chemicals, Kanada)

Tribulosin (Supelco, Německo)

Diosgenin (Toronto Research Chemicals, Kanada)

Dioscin (Toronto Research Chemicals, Kanada)

Protodioscin (Toronto Research Chemicals, Kanada)

[²H₃]-norbrassinolid (OlChemIm, Česká republika)

[²H₃]-24-*epikastasteron* (OlChemIm, Česká republika)

3.2 Rostlinný materiál

SSs byly izolovány ze vzorků suchých pletiv kotvičníku zemního (*Tribulus terrestris*). Jednotlivé vzorky obsahují různé části rostlin a pochází z různých zemí (Tab. 2). Vzorky č. 1-11 dodala firma Conneco Chemicals, s.r.o., Praha, Česká republika. Vzorek č. 12 pochází z FB Mercury Kopřivnice, Česká republika.

Tab. 2 – Přehled použitých vzorků kotvičníku zemního (*T. terrestris*) k izolaci steroidních saponinů. V tabulce je uvedeno, jaké rostlinné části vzorky obsahují a jaká je země jejich původu.

Vzorek č.	Typ vzorku, země původu
1	Semena + nat', Bulharsko
2	Plody + květy, Čína
3	Celá rostlina, Čína
4	Plody + květy, Indie
5	90% saponinový extrakt, Čína
6	Semena + nat', Bulharsko
7	Celá rostlina, Čína
8	Plody + květy, Čína
9	Semena, Čína
10	Celá rostlina, Čína
11	Plody + květy, Indie
12	Semena, Česká republika

3.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy Sartorius CPA225D (Sartorius Weighing Technology GmbH, Německo)

Kulový mlýnek MM 400 a kuličky ze ZrO₂ o průměru 2 mm (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Německo)

Transsonic 310 – ultrazvuková lázeň (Elma Schmidbauer GmbH, Německo)

Sonorex RK 510 s – ultrazvuková lázeň (Bandelin, Německo)

Rotátor Stuart SB3® (Bibby Scientific Ltd., Staffordshire, Anglie)

Centrifuga Hermle Z 36 HK (Hermle, Německo)

Vakuová komůrka Visiprep™ – Supelco (Sigma Aldrich, Německo)

Vakuový koncentrátor CentriVap® Acid-Resistant (Labconco Corp., MO, USA)

Infrared Vortex Mixer – WIZARD – přístroj pro míchání vzorků (VELP Scientifica, Itálie)

Millipore Simplicity 185 – zařízení na přípravu ultračisté vody (Millipore, USA)
Ultraúčinný kapalinový chromatograf Acquity I-class UPLC™ System (Waters, Milford, USA)
Kolona Acquity Phenyl-hexyl CSH® C18; 2.1×50 mm, 1.7µm (Waters, Irsko)
Tandemový hmotnostní spektrometr Xevo® TQ-XS (Waters MS Technologies, Manchester, Anglie)
pH metr pH 80+DHS® (XS Instruments, Itálie)
Mikrozkumavky 2 ml (VWR, USA)
Špičky a pipety Eppendorf (Eppendorf, Německo)
Zkumavky z borosilikátového skla 12×75 mm (FisherBrand, USA)
SPE kolonky Discovery® DPA-6S (50 mg/1ml; Supelco, USA)
SPE kolonky IST Isolute C8 (100 mg/1ml; Biotage, Švédsko)
SPE kolonky Clean-Up® Phenyl (50 mg/1 ml; UCT, USA)
Centrifugační filtry Nanosep, velikost pórů 0.2 µm, nylon (Pall Corp., USA)
LC vialky 2 ml, 9 mm ID (Sima-Aldrich, USA)
Inserty s kónickým dnem (200 µl, Supelco, USA)
Laboratorní sklo: odměrné válce, kádinky

3.4 Použité metody

SSs byly z rostlinného materiálu nejprve izolovány pomocí optimalizovaného postupu (kapitola 3.4.1) a následně byly analyzovány nově vyvinutou metodou založenou na využití UPLC-MS/MS (kapitola 3.4.4).

3.4.1 Optimalizace extrakce a izolace SSs

Aby mohly být SSs izolovány z reálného rostlinného materiálu, bylo nutné nejprve tuto metodu optimalizovat. K optimalizaci izolace SSs byla využita směs vybraných steroidních saponinů (sit-glu, diosgenin, protodioscin, dioscin, tribulosin) a dvou značených standardů ([²H₃]-norbrassinolid, [²H₃]-24-epikastasteron). Směs byla purifikována šesti různými postupy, které jsou popsány v Tab. 3 a 4.

Tab. 3 – Jednotlivé kroky protokolů č. 1-3 purifikace směsi standardů.

	Protokol č. 1 (DPA-6S)	Protokol č. 2 (Clean-Up Phenyl)	Protokol č. 3 (DPA-6S)
Příprava vzorku	1 ml 80% MeOH (-20 °C) + 25 pmol směsi std*	1 ml 80% MeOH (-20 °C) + 25 pmol směsi std*	1 ml 60% ACN (-20 °C) + 25 pmol směsi std*
Operace před SPE	-	Odpaření <i>in vacuo</i> **, rekonstrukce ve 25% MeOH	-
SPE kroky			
<i>Aktivace</i>	1 ml 100% MeOH	1 ml 100% MeOH	1 ml 100% ACN
<i>Ekvilibrace</i>	1 ml 80% MeOH	1 ml 25% MeOH	1 ml 60% ACN
<i>Nanesení vzorku</i>	1 ml vzorku v 80% MeOH	1 ml vzorku ve 25% MeOH	1 ml vzorku v 60% ACN
<i>Promytí</i>	-	1 ml 25% MeOH	-
<i>Eluce</i>	-	1 ml 100% ACN	-

* protodioscin (250 pmol), sit-glu, tribulosin, dioscin, diosgenin, [²H₃]-norbrassinolid a [²H₃]-24-epikastasteron; ** vakuový rotační koncentrátor, 37 °C

Tab. 4 – Jednotlivé kroky protokolů č. 4-6 purifikace směsi standardů.

	Protokol č. 4 (Clean-Up Phenyl)	Protokol č. 5 (C8)	Protokol č. 6 (DPA-6S)
Příprava vzorku	1 ml 80% MeOH (-20 °C) + 25 pmol směsi std*	1 ml 80% MeOH (-20 °C) + 25 pmol směsi std*	1 ml 80% EtOH (-20 °C) + 25 pmol směsi std*
Operace před SPE	Odpaření <i>in vacuo</i> **, rekonstrukce v 10% MeOH	Odpaření <i>in vacuo</i> **, rekonstrukce v 10% MeOH	-
SPE kroky			
<i>Aktivace</i>	1 ml 100% MeOH	1 ml 100% MeOH	1 ml 100% EtOH
<i>Ekvilibrace</i>	1 ml 10% MeOH	1 ml 10% MeOH	1 ml 80% EtOH
<i>Nanesení vzorku</i>	1 ml vzorku v 10% MeOH	1 ml vzorku v 10% MeOH	1 ml vzorku v 80% EtOH
<i>Promytí</i>	1 ml 10% MeOH	1 ml 10% MeOH	-
<i>Eluce</i>	1 ml 100% ACN	1 ml 100% ACN	-

* protodioscin (250 pmol), sit-glu, tribulosin, dioscin, diosgenin, [²H₃]-norbrassinolid a [²H₃]-24-epikastasteron; ** vakuový rotační koncentrátor, 37 °C

Po provedené purifikaci SSs, a tedy před samotným UPLC-MS/MS byly provedeny tyto operace: odpaření vzorků *in vacuo* (vakuový rotační koncentrátor, 37 °C), rekonstrukce vzorků v 50 µl 100% MeOH (protokol č. 6 – rekonstrukce v 50 µl 100% EtOH), filtrace přes mikrospin (centrifugační filtr z nylonu o velikosti pórů 0,2 µm, centrifugační rychlost 8000 rpm, 5 min, laboratorní teplota) a transfer do LC vialky s insertem.

3.4.2 Optimalizace navážky a matriční efekt

SSs byly izolovány ze suchých pletiv (DW) kotvičníku zemního (vzorek č. 10 – celá rostlina, Čína) o určené navážce (0 mg, 2 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 50 mg) ve třech opakováních. K izolaci steroidních saponinů byl vybrán protokol č. 1 (Tab. 3). Do zkumavek s kotvičníkem byl přidán 1 ml 80% metanolu vychlazeného na -20 °C a 50 µl směsi značených standardů ([²H₃]-norbrassinolid a [²H₃]-24-epikastasteron; každý o koncentraci 25 pmol). Poté byly přidány dvě kuličky ZrO₂ o průměru 2,8 mm a vzorky byly 3 minuty homogenizovány na kulovém mlýnku při frekvenci 27 Hz. Následovala sonifikace vzorků po dobu 5 minut a extrakce přes noc na rotátoru Stuart SB3 při 17 rpm a 4 °C.

Vzorky byly další den 10 minut centrifugovány při 20000 rpm a 4 °C. Supernatant byl odpipetován do čisté zkumavky a uskladněn v lednici. Pelet byl po přidání 1 ml 80% metanolu a 5 minutové sonifikaci reextrahován po dobu 60 minut. Takto reextrahované vzorky byly opět 10 minut centrifugovány při 20000 rpm a 4 °C. Supernatant byl přidán do zkumavek s první částí vzorku. Všechny vzorky byly přečištěny přes SPE kolonky DPA-6S (Supelco, part nr. 52624-U). Kolonky byly aktivovány pomocí 1 ml 100% metanolu. Ekvilibrace kolonek byla provedena pomocí 1 ml 80% metanolu a poté byly postupně naneseny 2 ml každého vzorku. Do čistých zkumavek byla sbírána frakce flow through, která byla následně odpařena do sucha ve vakuovém rotačním koncentrátoru při 37 °C.

3.4.3 Izolace a purifikace SSs z rostlinného materiálu

K izolaci SSs z reálných rostlinných vzorků byl využit protokol č. 1 (Tab. 3). Do mikrozkušavek byly naváženy vzorky suchých pletiv (DW) o zjištěné optimální hmotnosti přibližně 5 mg. SSs byly izolovány celkem ze 12 vzorků kotvičníku zemního. Každý vzorek byl zpracován ve třech opakováních. Postup byl dále stejný jako v předchozí kapitole 3.4.2.

Experiment byl proveden ještě jednou, a to s neoptimální navážkou přibližně 25 mg suchého pletiva kotvičníku zemního.

3.4.4 Vývoj a optimalizace UPLC-MS/MS metody analýzy SSs

Byla vyvinuta metoda pro separaci a kvantifikaci SSs za využití UPLC-MS/MS. Separace saponinů byla optimalizována pomocí celkem šesti různých UPLC kolon, jejichž charakteristiky jsou uvedeny v Tab. 5 níže. SSs byly z UPLC kolon eluovány pomocí programu gradientové eluce dle Tab. 6. V rámci optimalizace byly sledovány parametry jako je symetrie píku A_s , tailing faktor T_f a šířka píku v základně W .

Tab. 5 – Souhrn charakteristik UPLC kolon použitých v optimalizaci metody kvantifikace vybraných SSs.

LC kolona	I.D.* (mm)	Délka (mm)	Velikost částic (μm)	Obsah uhlíku (%)	pH stabilita	Charakter částic	Velikost pórů ($\text{\AA}$)
C4	2,1	150	1,7	8	2-12	hybrid	300
HSS	2,1	50	1,8	11	2-8	silica	100
Fenyl-hexyl CSH	2,1	50	1,7	14	1-11	hybrid	130
CSH C18	2,1	50	1,7	15	1-11	hybrid	130
Kinetex C18 EVO	2,1	50	1,7	11	1-12	hybrid	100
Arion Plus C18	3,0	100	3,0	18	1-10	hybrid	100

*I.D – vnitřní průměr

Tab. 6 - Program gradientové eluce SSs na UPLC koloně. K eluci bylo využito těchto rozpouštědel: 100% acetonitril, kyselina mravenčí ve vodě (10 mM).

Čas (min)	% A	% B	Eluční křivka
0,0	25	75	
12,5	100	0	6
13,5	100	0	1
14,0	25	75	6
17,0	25	75	1

A – 100% acetonitril; B – 10 mM kyselina
mravenčí ve vodě

Separované látky eluované z UPLC kolony vstupovaly do hmotnostního spektrometru (MS), kde byly ionizovány za pomoci elektrospreje pracujícího v pozitivním módu (ES^+). Detekce

látek pro účely kvantitativní analýzy SSs byla provedena tandemovým MS operujícím v režimu vícenásobného monitorování rozpadu iontu (angl. multiple reaction monitoring; MRM) za následujících podmínek: napětí na ESI kapiláře 3,1 kV, teplota v iontovém zdroji byla nastavena na 150 °C, desolvatační teplota byla 600 °C, průtok desolvatačního plynu (dusíku) byl 1000 l/h a průtok kolizního plynu (argonu) 0,15 ml/min.

Pro účely MS detekce bylo pro každou z látek nejprve změřeno fullscan spektrum v pozitivním módu ES, aby byla zjištěna hodnota prekurzorového iontu (Tab. 7). Na základě této hodnoty byla pro každou látku změřena i spektra produktových iontů, u nichž byl vybrán iont příslušného poměru m/z s nejvyšší intenzitou za účelem nastavení funkce a kvantifikace dané látky (kvantifikační MRM přechod) a dále druhý nejintenzivnější iont v pořadí pro účely potvrzení jeho identity (konfirmační MRM přechod) – oba přechody viz Tab. 7. Nově nalezené MRM kvantifikační přechody byly použity pro měření kalibračních křivek pro každou ze sledovaných látek v rozsahu 0,1 až 10 pmol/nástřik. Kalibrační křivky byly v celém rozsahu lineární s charakteristikami uvedenými v Tab. 8.

Tab. 7 – Tabulované ES^+ hmotnostní spektra SSs a spektra jejich produktových iontů normalizované k nejabundantnějšímu z nich (vyznačen tučně).

	Mr (g/mol)	m/z prekurzorového iontu v ES^+	m/z produktových iontů v ES^+ (relativní intenzita, %)
Protodioscin	1049,20	1031,0	884,9 (45); 739,0 (40); 577,0 (50); 415,0 (70)
Sit-Glu	576,85	397,2	161,2 (30); 147,1 (70)
Tribulosin	1151,29	724,9	579,1 (25); 417,0 (50); 254,8 (100)
Dioscin	869,04	869,1	577,0 (30); 415,0 (100); 396,9 (50)
Diosgenin	414,62	415,1	270,9 (100); 252,9 (50); 156,9 (30)

Tab. 8 – Retenční čas a charakteristiky regresních kalibračních křivek studovaných SSs.

	RT (min)	Rovnice kalibrační přímky	Korelační koeficient R^2
Protodioscin	1,31	$\log y = 1,1100 (\log x) - 3,7105$	0,9925
Sit-Glu	8,47	$\log y = 0,5840 (\log x) + 0,1007$	0,9810
Tribulosin	4,55	$\log y = 0,9958 (\log x) - 2,5648$	0,9988
Dioscin	4,48	$\log y = 0,9689 (\log x) - 2,7089$	0,9949
Diosgenin	7,46	$\log y = 0,9362 (\log x) + 0,581$	0,9993

Tab. 9 – *Podmínky MS pro detekci studovaných SSs.*

	Kvantifikační MRM přechod	Napětí na koloně (V)	Kolizní energie (V)
Protodioscin	1031,0 > 415,1	25	28
Sit-Glu	397,2 > 147,1	30	26
Tribulosin	724,9 > 254,8	15	28
Dioscin	869,1 > 415,0	20	20
Diosgenin	415,1 > 270,9	15	16

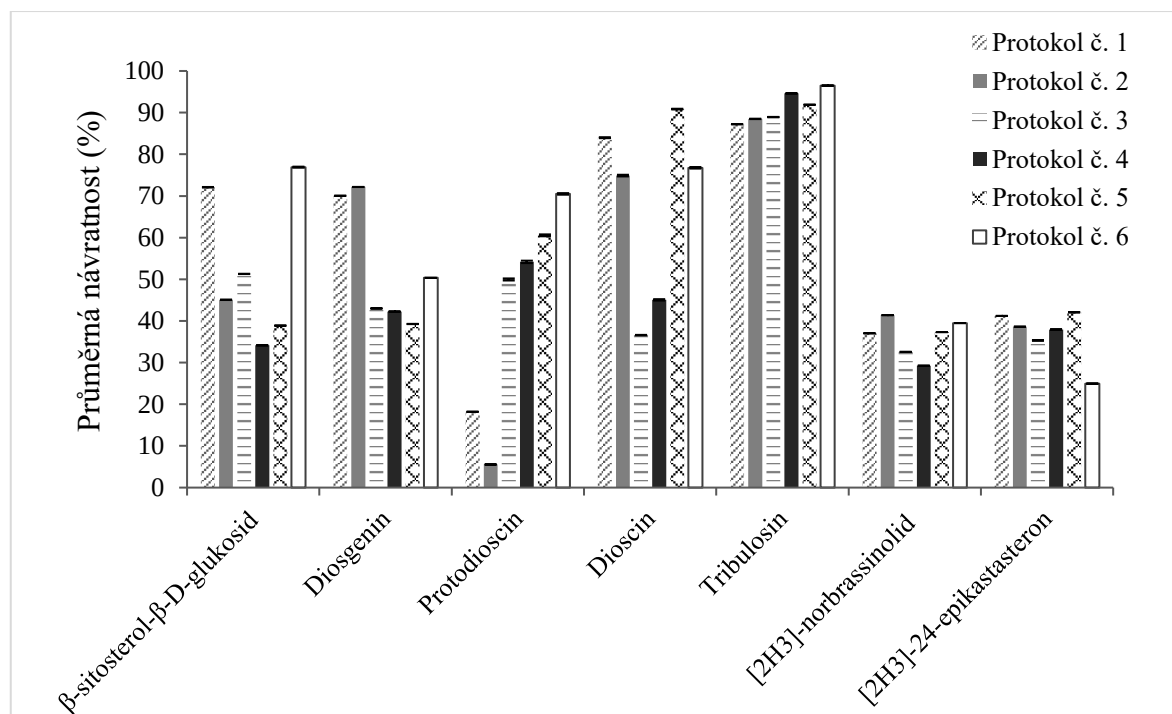
3.4.5 UPLC-MS/MS analýza SSs

K analýze byly všechny vzorky odpařené po SPE rekonstruovány v 50 µl 100% metanolu (vzorky získané podle protokolu č. 6 byly rekonstruovány ve 100% etanolu), promíchány na vortexu, 5 minut sonifikovány a filtrovány pomocí centrifugačního mikrofiltru při 8000 rpm po dobu 5 minut. Poté byly vzorky přepipetovány do vialek s kónickým insertem (Supelco, SU860066). 2 µl z každého vzorku byly nastříknuty na UPLC-MS/MS do gradientu pro SSs (délka trvání 17 minut) – viz Tab. 6.

4 VÝSLEDKY

4.1 Optimalizace postupu izolace a purifikace SSs

Izolace a purifikace SSs byla provedena podle šesti protokolů uvedených v kapitole 3.4 výše (Tab. 3 a 4). Průměrné návratnosti jednotlivých metod se pro každou látku lišily a jsou znázorněny na Obr. 17.



Obr. 17 – Graf průměrné návratnosti (%) jednotlivých steroidních saponinů po purifikaci směsi standardních steroidních saponinů podle šesti protokolů uvedených v kapitole 3.4.1 výše.

4.2 Vývoj a optimalizace UPLC-MS/MS metody analýzy SSs

Optimalizace UPLC-MS/MS metody byla provedena s využitím šesti UPLC kolon s různými vlastnostmi, které jsou uvedené v Tab. 5. Výsledné parametry separace vybraných SSs na zmíněných kolonách jsou uvedeny v Tab. 10-13. Tab. 14 obsahuje výsledné parametry vybrané kolony fenyl-hexyl CSH po změně nástřiku z 20 pmol na 1 pmol.

Tab. 10 – Retenční čas R_T (min) studovaných SSs na UPLC kolonách s různým typem sorbentu při nástriku 20 pmol do gradientu dle Tab. 6 výše.

	Typ kolony					
	C4	HSS	Fenyl- hexyl CSH	C18 CSH	Kinetex EVO	Arion Plus C18
	Retenční čas R_T (min)					
Sit-glu	8,29	12,59	8,47	12,17	9,95	ND
Diosgenin	7,49	11,22	7,46	10,36	8,68	ND
Protodioscin	2,42	1,63	1,31	1,46	1,14	3,16
Dioscin	5,01	5,68	4,48	5,59	4,34	9,02
Tribulosin	4,99	5,68	4,55	5,72	4,42	9,07

Tab. 11 – Šířka píků W (min) studovaných SSs na UPLC kolonách s různým typem sorbentu při nástriku 20 pmol do gradientu dle Tab. 6 výše.

	Typ kolony					
	C4	HSS	Fenyl- hexyl CSH	C18 CSH	Kinetex EVO	Arion Plus C18
	Šířka píku W (min)					
Sit-glu	0,2325	0,2736	0,2237	0,2336	0,2381	-
Diosgenin	0,2611	0,3493	0,2333	0,3349	0,2539	-
Protodioscin	0,1294	0,2739	0,1754	0,2213	0,1876	0,1438
Dioscin	0,1623	0,2200	0,1587	0,2133	0,1571	0,2303
Tribulosin	0,2761	0,1841	0,1292	0,1815	0,1457	0,2089
Průměr W (min)	0,2123	0,2602	0,1841	0,2369	0,1963	-
Rozlišení R_s^*	0,0912	0,0000	0,5557	0,6586	0,5284	0,2277

*Rozlišení píků dioscinu a tribulosinu; výpočet dle rovnice: $R_s = \frac{2 \cdot (t_2 - t_1)}{(W_1 + W_2)}$

Tab. 12 – Faktor asymetrie A_s studovaných SSs na UPLC kolonách s různým typem sorbentu při nástriku 20 pmol do gradientu dle Tab. 6 výše.

	Typ kolony					
	C4	HSS	Fenyl- hexyl CSH	C18 CSH	Kinetex EVO	Arion Plus C18
	Faktor asymetrie A_s *					
Sit-glu	0,90	0,78	0,88	0,94	1,60	-
Diosgenin	1,00	0,69	0,86	0,76	0,85	-
Protodioscin	0,83	0,46	0,51	0,50	0,59	0,93
Dioscin	0,96	0,78	0,76	0,72	0,93	0,92
Tribulosin	1,46	0,93	0,99	1,06	1,23	1,10
Průměr A_s	1,03	0,73	0,80	0,80	1,04	-

*Výpočet dle rovnice: $A_s = \frac{t_p}{f_p}$

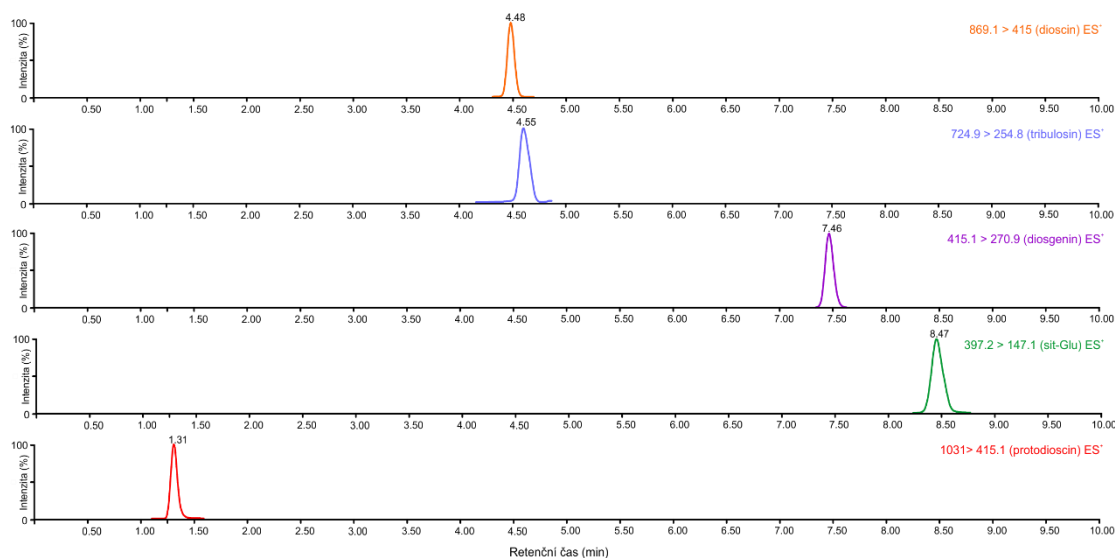
Tab. 13 – Tailing faktor T_f studovaných SSs na UPLC kolonách s různým typem sorbentu při nástriku 20 pmol do gradientu dle Tab. 6 výše.

	Typ kolony					
	C4	HSS	Fenyl- hexyl CSH	C18 CSH	Kinetex EVO	Arion Plus C18
	Tailing faktor T_f *					
Sit-glu	1,06	1,14	1,07	1,03	0,81	-
Diosgenin	1,00	1,23	1,08	1,16	1,09	-
Protodioscin	1,10	1,59	1,47	1,50	1,34	1,04
Dioscin	1,02	1,14	1,16	1,20	1,04	1,05
Tribulosin	0,84	1,04	1,01	0,97	0,91	0,95
Průměr T_f	1,00	1,23	1,16	1,17	1,04	-

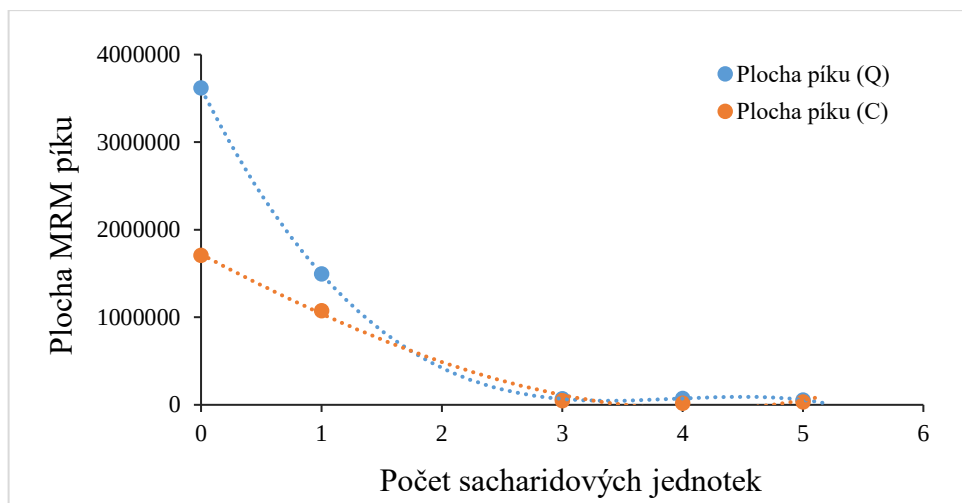
*Výpočet dle rovnice: $T_f = \frac{f_{5\%} + t_{5\%}}{2f_{5\%}}$

Tab. 14 – Chromatografické charakteristiky studovaných SSs na koloně fenyl-hexyl CSH 2,1x50 mm; 1,7 μm při nástřiku 1 pmol do gradientu dle Tab. 6 výše.

	RT (min)	W (min)	A _s	T _f
Sit-glu	8,47	0,2022	0,72	1,20
Diosgenin	7,46	0,2370	0,68	1,23
Protodioscin	1,32	0,1997	0,54	1,43
Dioscin	4,48	0,1732	0,61	1,32
Tribulosin	4,54	0,1266	0,64	1,28
Průměr		0,1877	0,64	1,29



Obr. 18 – (+)ESI-LC-MS/MS chromatogram separace pěti SSs na koloně Acquity UPLC[®] CSH[™] Phenyl-Hexyl 2,1x50 mm; 1,7 μm (Waters) při 1 pmol/nástřik. Průtok mobilní fáze 0,3 ml/min, gradientová eluce dle programu uvedeného v Tab. 6 za pomoci acetonitrilu (mobilní fáze A) a 10 mM kyseliny mravenčí ve vodě (mobilní fáze B). Kolona byla termostatována při 40 °C.



Obr. 19 – Závislost plochy LC-MS píku na počtu sacharidových jednotek v molekule steroidního saponinu. Q – MRM přechod pro kvantifikaci analytu, C – MRM přechod pro potvrzení analytu.

Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) pro každý steroidní saponin byl vypočítán z experimentálních dat (pět kalibračních křivek obecné rovnice $y = kx + b$) pomocí rovnice x a y, kde s_b je směrodatná odchylka posunutí b na ose y a k je průměrná hodnota směrnice pěti nezávislých měření (Araujo 2009).

$$LOD = 3 \times s_b / k \dots \text{rovnice x}$$

$$LOQ = 10 \times s_b / k \dots \text{rovnice y}$$

Tab. 15 – Limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ) vybraných SSs analyzovaných optimalizovanou UPLC-MS/MS metodou.

	S/N (0,1 pmol)	LOD (pg)	LOQ (pg)
Sit-glu	1054,87	0,17	0,55
Diosgenin	582,62	0,22	0,73
Protodioscin	624,09	0,52	1,74
Dioscin	279,38	0,97	3,25
Tribulosin	308,00	1,13	3,77

4.3 Stanovení SSs v rostlinném materiálu

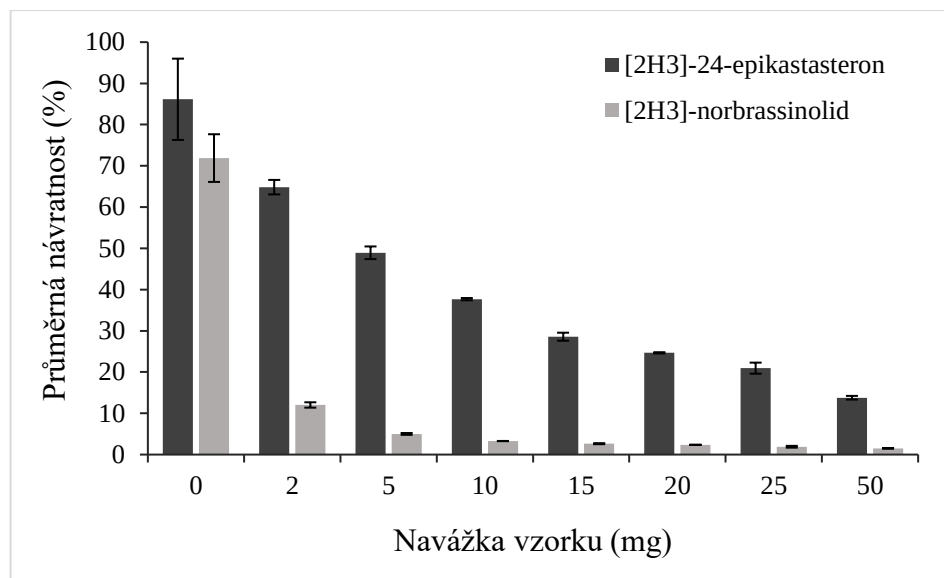
4.3.1 Ideální navážka a matriční efekt

Ke zjištění ideální navážky suchého pletiva pro izolaci SSs byl použit vzorek č. 10 (celá rostlina kotvičníku zemního, původem z Číny). Celkem byl změřen obsah SSs v sedmi různých navážkách suchého pletiva (2 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg a 50 mg) ve třech opakováních (Tab. 16). V tomto experimentu byl zjištěn také matriční efekt ostatních látek koextrahovaných z kotvičníku, které by mohly ovlivňovat samotné stanovení SSs (Obr. 20).

Tab. 16 – Obsah SSs (sit-glu, diosgeninu, protodioscinu, dioscinu a tribulosinu) ve vzorku č. 10 při sedmi různých navážkách suchého pletiva kotvičníku zemního.

DW (mg)	Obsah (ng/g DW)*		Obsah (µg/g DW)*		
	Sit-glu	Diosgenin	Protodioscin	Dioscin	Tribulosin
2	11,50	34,46	6790,18	149,96	14,38
5	35,06	46,50	8838,42	130,57	12,52
10	49,74	55,56	7206,18	110,14	10,82
15	67,43	59,33	3928,42	96,99	9,82
20	90,32	55,69	2842,39	78,92	8,71
25	106,35	54,43	2578,16	70,49	8,28
50	102,75	55,58	1959,82	88,60	7,09

*Hodnoty reprezentují průměr 3 nezávislých stanovení.



Obr. 20 – Matriční efekt při stanovení SSs. V grafu je znázorněna průměrná návratnost značených standardů ($[^2\text{H}_3]$ -norbrassinolidu a $[^2\text{H}_3]$ -24-epikastasteronu) po optimalizované extrakci a purifikaci zvolených navážek kotvičníku zemního (vzorek č. 10).

4.3.2 Stanovení SSs v kotvičníku zemním (optimalizovaná navážka 5 mg)

Po zjištění ideální navážky byla kvantifikace SSs ze vzorků kotvičníku zemního provedena s navážkou přibližně 5 mg. Celkem byl experiment proveden se dvanácti různými vzorky kotvičníku zemního (jednotlivé vzorky jsou popsány v Tab. 2) ve třech opakováních. Obsah steroidních saponinů je uveden v Tab. 17.

Tab. 17 – Obsah SSs (*sit-glu*, *diosgeninu*, *protodioscinu*, *dioscinu* a *tribulosinu*) ve vzorcích 5 mg suchého pletiva kotvičníku zemního.

Vzorek č.	Obsah (ng/g DW)*		Obsah (μg/g DW)*		
	Sit-glu	Diosgenin	Protodioscin	Dioscin	Tribulosin
1	35,32	15,07	265,39	11,82	4,64
2	46,17	2,60	4,39	<LOD	0,11
3	11,53	25,31	982,44	24,99	10,58
4	30,85	0,11	2,06	0,02	0,22
5	37,44	29,87	0,46	0,14	0,75
6	13,15	51,82	183,41	8,18	5,07
7	3,59	70,44	209,51	6,59	5,74
8	54,82	1,20	0,78	0,01	0,77
9	37,07	0,22	3,92	0,01	0,03
10	14,14	32,64	715,91	23,87	12,38
11	49,92	0,83	0,74	<LOD	0,70
12	7,04	3,17	83,09	4,50	2,39

*Hodnoty reprezentují průměr 3 nezávislých stanovení.

4.3.3 Stanovení SSs v kotvičníku zemním (neoptimalizovaná navážka 25 mg)

Další izolace a kvantifikace SSs byla provedena z 25 mg vzorku. Experiment byl opět proveden se dvanácti různými vzorky kotvičníku zemního ve třech opakováních. Zjištěný obsah jednotlivých SSs je uveden v Tab. 18.

Tab. 18 – Obsah SSs (sit-glu, diosgeninu, protodioscinu, dioscinu a tribulosinu) ve vzorcích 25 mg suchého pletiva kotvičníku zemního.

Vzorek č.	Obsah (ng/g DW)*		Obsah (μg/g DW)*		
	Sit-glu	Diosgenin	Protodioscin	Dioscin	Tribulosin
1	333,69	46,45	2642,41	66,90	8,30
2	260,07	12,01	35,08	0,13	2,18
3	375,77	127,30	3376,29	242,72	25,40
4	86,64	0,53	15,48	0,09	1,75
5	308,73	265,77	6,15	4,93	14,34
6	225,20	162,45	1971,67	57,49	10,67
7	55,64	208,45	3572,54	68,98	11,55
8	363,12	4,94	1,89	0,06	13,11
9	83,96	0,51	41,50	0,06	0,50
10	381,94	149,78	3504,78	253,61	27,58
11	378,41	4,34	5,40	0,15	14,32
12	855,10	39,43	759,09	26,78	4,79

*Hodnoty reprezentují průměr 3 nezávislých stanovení.

5 DISKUZE

5.1 Optimalizace metod izolace a analýzy SSs

K izolaci SSs je ve větším množství vědeckých prací využita extrakce kapalina-kapalina (LLE). Již v menší míře se SSs extrahují pomocí extrakce na pevné fázi (SPE). SPE byla použita např. v práci Dinchev et al. 2008. V této diplomové práci byla k izolaci a purifikaci SSs zvolena také metoda SPE. Optimalizace SPE metody byla provedena s využitím celkem šesti různých protokolů (Tab. 3 a 4). Nakonec byl jako ideální protokol k izolaci a purifikaci steroidních saponinů vybrán protokol č. 1 (Tab. 3). V rámci tohoto protokolu jsou SSs extrahovány pomocí 80% MeOH a hrubý extrakt je následně purifikován přes SPE kolonku DPA-6S (Supelco, part nr. 52624-U). Zájmové sloučeniny se na sorbentu této kolonky nezachycují a procházejí skrz do připravené zkumavky. Charakter sorbentu naopak umožňuje retenci interferujících sloučenin z rostlinného pletiva, jako jsou zejména rostlinné pigmenty, fenolické látky apod. Návratnost vybraných steroidních saponinů (sit-glu, diosgeninu, protodioscinu, dioscinu, tribulosinu) včetně zvolených interních standardů ($[^2\text{H}_3]$ -norbrassinolidu a $[^2\text{H}_3]$ -24-epikastasteronu) se pohybuje od 18,20 % (protodioscin) do 87,22 % (tribulosin). Průměrná návratnost tohoto postupu byla 58,54 %, což je nejlepší hodnota návratnosti ze všech testovaných protokolů, s výjimkou protokolu č. 6, kde průměrná návratnost činila 62,21 %. Tento protokol byl testován z toho důvodu, že Ganzera a jeho tým ve své práci z roku 2001 uvádí, že se protodioscin v prostředí metanolu při laboratorní teplotě metyluje na 22-O-metylprotodioscin. Výsledky návratnosti protodioscinu dosažené ostatními postupy, které zahrnují také metanol, dosahovaly podobných hodnot jako protokol s etanolem (průměrná návratnost protodioscinu byla 70,49 %). Z tohoto důvodu není předpokládána metylace protodioscinu za vzniku 22-O-metylprotodioscinu, ačkoliv nebyla přímo provedena detekce jeho přítomnosti.

Vzhledem k tomu, že žádná metoda analýzy SSs nebyla na pracovišti k dispozici, byla v rámci této diplomové práce metoda pro vybrané zástupce SSs vyvinuta a optimalizována. K separaci látek byla zvolena technika UPLC a detekce byla provedena pomocí MS/MS. Tvar píků, retence a další chromatografické charakteristiky jednotlivých SSs byly stanoveny na šesti různých kolonách typu reverzní fáze (jejich vlastnosti jsou uvedeny v Tab. 5). Asymetrie píků byla vyjádřena pomocí dvou metod, a to určením tzv. faktoru symetrie píku A_s a určením tzv. tailing faktoru T_f (Skoog et al. 2019). Faktor A_s zobrazuje míru souměrnosti chromatografického píku a je vyjádřen jako poměr šířky píku vzestupné (t_p) k sestupné (f_p) části píku, nejčastěji v 5 % nebo 10 % výšky píku (rovnice v Tab. 12). Téměř každý chromatografický pík může vykazovat určitý stupeň chvostování nebo frontování. Akceptovatelné hodnoty A_s leží v rozmezí 0,9 (nepatrné chvostování) až 1,5 (mírné frontování). Asymetrie píku je nežádoucí, neboť souvisí s účinností kolony a má negativní vliv na integraci píku, zejména když je nízký poměr signál/šum (S/N). Hodnoty A_s pod 0,9 a nad 1,5 se obvykle považují za neakceptovatelné. Jak ukazuje Tab. 14, v praxi uvedenému rozsahu A_s vyhovuje jen kolona C4. Na ní ale bohužel lze dosáhnout pouze nízkého rozlišení ($R_s = 0,0912$ min) dvou koeluuujících sločenin tribulosinu a dioscinu. Zcela nevyhovující zejména pro sit-glu je kolona Kinetex EVO, kde dochází k silnému frontování píku ($A_s = 1,6$). Druhou možností, jak číselně vyjádřit symetrii píku, je výpočet hodnoty tzv. tailing faktoru T_f . Ten je vyjádřen jako šířka píku k dvojnásobku šířky píku vzestupné části (t_p) v 5 % výšky píku (rovnice v Tab. 13). Akceptovatelné hodnoty pro T_f se pohybují ve stejném rozmezí jako A_s , a to od 0,9 do 1,5. Hodnoty T_f pod 0,9 jsou neakceptovatelné (frontování), stejně jako ty nad 1,5 (chvostování). Z tohoto pohledu nevyhovují kolony C4 ($T_f = 0,84$ pro tribulosin), HSS ($T_f = 1,59$ pro protodioscin), C18 CSH ($T_f = 1,5$ pro protodioscin) ani Kinetex EVO ($T_f = 0,81$ pro sit-glu). K frontování píku může docházet také, jestliže je překročena vzorkovací kapacita analytické kolony. Tento efekt nadměrného zatížení kolony vzorkem je nejčastěji výsledkem špatné rozpustnosti vzorku ve stacionární fázi nebo nadávkování příliš velkého množství vzorku. Odtud pak plyne i řešení těchto nežádoucích jevů: 1. snížit koncentraci rozpuštěné látky ve vzorku a 2. snížit nastříkovaný objem vzorku. U vybrané kolony fenyl-hexyl CSH byla snížena koncentrace analytu v nástřiku z 20 pmol na 1 pmol – viz Tab. 14.

Nejsymetričtějších píků bylo dosaženo na koloně fenyl-hexyl CSH, kde je zároveň i průměrná šířka všech sledovaných píků nejnižší. Rozlišení R_s dvou koelujících píků tribulosinu a dioscinu zde dosahuje hodnoty přibližně 0,56 (viz Tab. 11), což je druhá nejlepší hodnota dosažená pro tento parametr. Nejlepší R_s bylo dosaženo na koloně CSH C18, kde ale všechny píky vykazují větší šířku v základně (v průměru o 22,3 % – Tab. 11). Pro separaci steroidních saponinů byla tedy použita kolona fenyl-hexyl CSH. Další testovaná kolona Arion C18 plus obsahuje velmi hydrofobní sorbent (obsah uhlíku je 18 %), který i přes jakoukoli optimalizaci gradientu neumožňuje eluci dvou nejhydrofobnějších látek ze zvolené směsi (sit-glu a diosgeninu) při zachování retence nejhydrofilnější látky ve směsi (protodioscinu). Tvar píků ale na tomto sorbentu pro ostatní separované látky dosahuje nejlepších charakteristik, a proto by bylo možné tento sorbent v polárnější verzi (Arion® Polar C18) doporučit pro další optimalizaci separace vybraných steroidních saponinů.

SSs byly z UPLC systému eluovány programem gradientové eluce podle Tab. 6. Typ vybraných rozpouštědel nebyl širěji optimalizován, neboť všechny látky měly přiměřenou retenci a rozlišení píků na vybraných sorbentech UPLC kolon.

Při UPLC-MS/MS analýze byla také zjištěna závislost mezi plochou píku a počtem sacharidových jednotek v molekule steroidního saponinu (Obr. 19). Diosgenin, jenž představuje svou strukturou pouze aglykon, dosahuje nejvyšší plochy píku. S přibývajícím počtem sacharidů v molekule se plocha píku při zachování stejné koncentrace v nástriku zmenšuje v řadě sit-glu (jedna sacharidová jednotka) > dioscin (tři sacharidové jednotky) > protodioscin (čtyři sacharidové jednotky) > tribulosin (pět sacharidových jednotek).

Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) vybraných SSs jsou uvedeny v Tab. 15. Hodnoty LOD/LOQ se pohybují v rozmezí desítek až jednotek pg. V publikovaných pracích nejsou limity detekce pro SSs obvykle uváděny, proto nelze tyto hodnoty porovnat s jinými autory. Publikované metodiky jsou totiž zaměřeny spíše na strukturní než kvantitativní analýzu. Minimálně pro analýzu obsahových látek v kotvičníku zemním jde o první metodu kvantitativní analýzy v mikroměřítku.

5.2 Obsah SSs v rostlinném materiálu

SSs byly z rostlinného materiálu izolovány a purifikovány podle protokolu č. 1 (Tab. č. 3). V rámci tohoto protokolu jsou SSs izolovány z kotvičníku zemního pomocí 80% metanolu, homogenizace na kulovém mlýnku, sonifikace a centrifugace a purifikovány přes SPE kolonku DPA-6S (Supelco, part nr. 52624-U).

Před samotným měřením obsahu SSs v kotvičníku zemním byla provedena optimalizace navážky s ohledem na určení míry vlivu matrice na intenzitu LC-MS signálu analyzovaných sloučenin (matriční efekt). V rozmezí navážek 2 až 50 mg DW bylo zjištěno, že nejvyšší množství protodioscinu, který představuje nejabundantnější steroidní saponin kotvičníku, lze detekovat při navážce 5 mg DW. Při vyšších navážkách kotvičníku již obsah protodioscinu vlivem matrice klesal. Ostatní SSs dosahovaly nejvyšších hodnot při navážkách 2 mg (dioscin, tribulosin), 25 mg (sit-glu) a 15 mg (diosgenin). Jelikož nebyl mezi obsahem steroidních saponinů při jejich optimální navážce a navážce 5 mg signifikantní rozdíl, byla jako celková ideální navážka vybrána navážka 5 mg.

Protože byla kvantifikace SSs prováděna metodou izotopového zředování, bylo nutné stanovit vliv matrice na návratnost použitých značených standardů, [$^2\text{H}_3$]-norbrassinolidu a [$^2\text{H}_3$]-24-epikastasteronu (Obr. 20). Ve vzorcích bez matrice bylo dosaženo průměrné návratnosti 79,02 % ([$^2\text{H}_3$]-norbrassinolid – 71,89 %, [$^2\text{H}_3$]-24-epikastasteron – 86,15 %). Se zvyšující se navážkou kotvičníku postupně výrazně klesá průměrná návratnost obou standardů (více u polárnějšího [$^2\text{H}_3$]-norbrassinolidu), přičemž už při navážce 2 mg DW dosahuje pouze 38,44 % a u 5 mg DW pak 26,97 %.

SSs byly izolovány a kvantifikovány ve vybrané kompromisní navážce 5 mg kotvičníku zemního (Tab. 17). Jednotlivé vzorky se lišily obsaženými rostlinnými částmi a také svým původem. V literatuře je uváděno, že se obsah steroidních saponinů liší v závislosti na mnoha faktorech (Ștefănescu et al. 2020; Dinchev et al. 2008; Lazarova et al. 2014). Záleží na geografických podmínkách či na fázi vývoje rostliny. Obsah steroidních saponinů je odlišný také v rámci rostlinných částí. Z tohoto důvodu jsou pro každý vzorek získány rozdílné výsledky obsahu steroidních saponinů. Za nejvíce zastoupený steroidní saponin je považován protodioscin, jak již bylo zmíněno. Proto je ho také ve většině analyzovaných vzorků nejvíce. Jeho množství je 0,46-982,44 $\mu\text{g/g}$. Dioscin představuje aglykon protodioscinu, ve své struktuře tedy neobsahuje sacharidovou část. Hladiny dioscinu mají podobný trend ve vzorcích jako protodioscin, jsou však obsaženy v nižší koncentraci (<LOD-24,99 $\mu\text{g/g}$). Detekované množství tribulosinu se pohybovalo

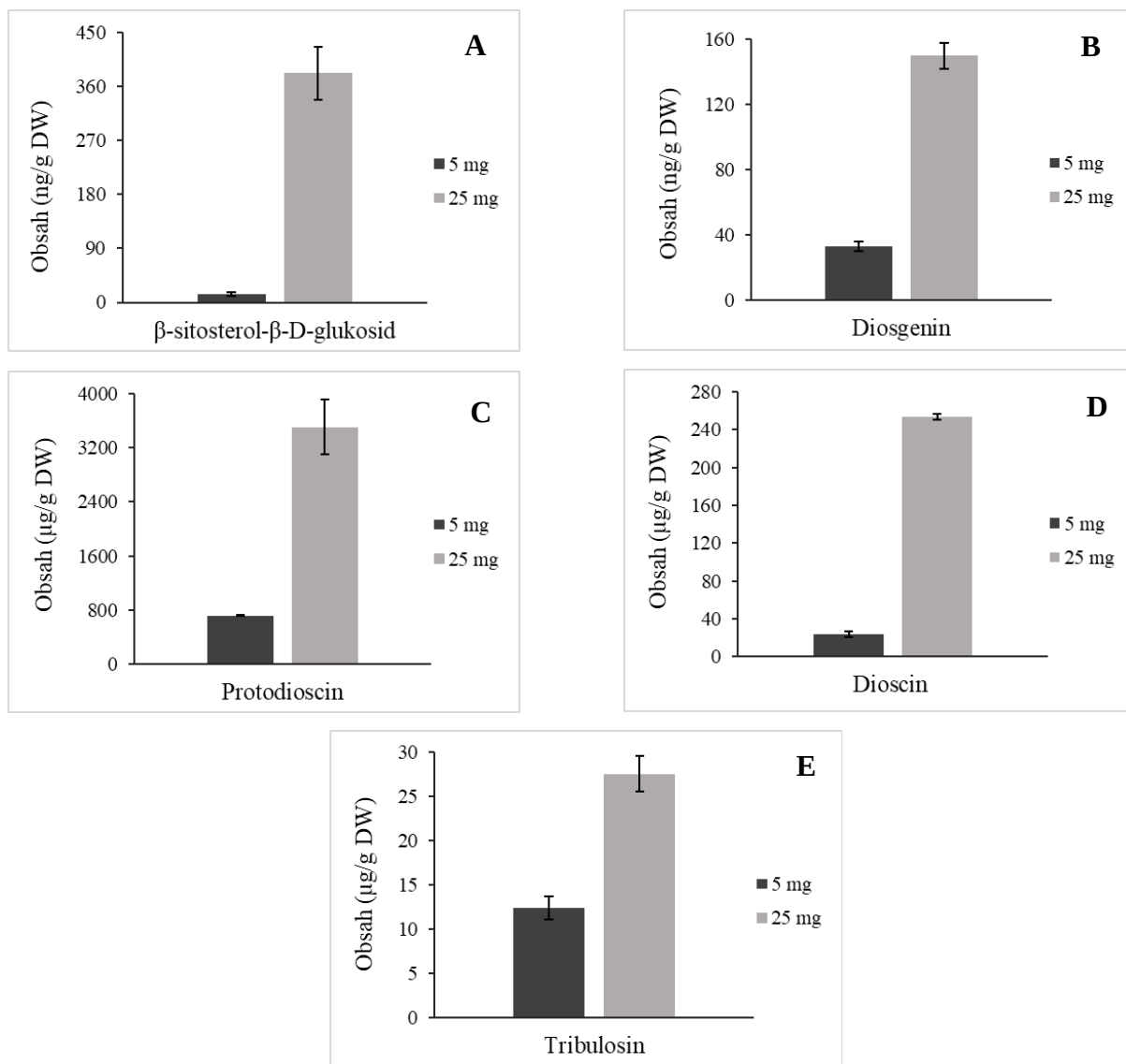
od 0,03 µg/g do 12,38 µg/g. Nejméně zastoupené SSs představovaly sit-glu a diosgenin. Jejich množství v kotvičnicku zemním se pohybovalo maximálně v desítkách ng/g (sit-glu – 3,59-54,82 ng/g; diosgenin – 0,11-70,44 ng/g).

Naměřené hodnoty množství steroidních saponinů, jež se v každém vzorku kotvičnicku zemního liší, korelují s publikacemi, ve kterých je také popsán jiný obsah steroidních saponinů v každém vzorku. V Tab. 19 je uvedeno množství protodioscinu, dioscinu a tribulosinu získaných výsledků ve srovnání s daty z literatury.

Tab. 19 – Rozsah množství protodioscinu, dioscinu a tribulosinu stanovený ve vzorcích č. 1-12 a rozsah jejich množství zaznamenaný v literatuře. Všechny tyto tři SSs byly izolovány a kvantifikovány z kotvičnicku zemního, původem z různých zemí světa (např. z Bulharska, Indie, Číny či Ruska).

	Obsah steroidních saponinů (µg/g)		
	Protodioscin	Dioscin	Tribulosin
Vzorky č. 1-12	0,46-982,44	<LOD-24,99	0,03-12,38
Dinchev et al. 2008	2,40-10270,30	<LOD-921,90	<LOD-6442,10
Lazarova et al. 2011	3790,00-15280,00	<LOD-4350,00	-
Stavrianidi et al. 2017	350,00	8,00	-
Sarvin et al. 2018	600,00-1900,00	320,00-620,00	-
Ganzera et al. 2001	<LOD-13370,00	-	-

Dále byla provedena izolace a kvantifikace SSs v 25 mg kotvičnicku zemního. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 18. Množství jednotlivých steroidních saponinů ve vzorcích by tedy měla být 5x vyšší než při navážce 5 mg. Na Obr. 21 je zobrazeno srovnání průměrného naměřeného množství steroidních saponinů v obou navážkách vzorku č. 10 kotvičnicku zemního. Naměřené hodnoty obsahu SSs v navážce 25 mg většinou neodpovídají pětinasobku hodnot obsahu SSs naměřených při navážce 5 mg. Navážka 25 mg nemohla být vybrána jako optimální i z důvodu, že zde matriční efekt snižuje návratnost značených interních standardů ($^2\text{H}_3$]-norbrassinolidu – 5,59 %, [$^2\text{H}_3$]-24-epikastasteronu – 18,62 %) a snižuje tak přesnost kvantifikace vybraných SSs.



Obr. 21 – Srovnání naměřeného množství vybraných SSs v kotvičniku zemním (vzorek č. 10) při optimalizované a neoptimalizované navážce: **A** – sit-glu, **B** – diosgenin, **C** – protodioscin, **D** – dioscin, **E** – tribulosin.

Hodnoty obsahu SSs získané pro navážky 5 mg a 25 mg při optimalizaci navážky suchého pletiva kotvičniku zemního (vzorek č. 10; Tab. 16) se liší od hodnot získaných pro tentýž vzorek při měření obsahu SSs při navážkách 5 mg a 25 mg (Tab. 17 a 18). Tento rozdíl mohl být způsoben faktem, že měření probíhala v jiný den a přístroj použitý k analýze mohl vykazovat odlišnou citlivost.

6 ZÁVĚR

Rostlinné sekundární metabolity SSs se skládají ze steroidního aglykonu a z glykonu. SSs vykazují mnoho účinků v samotných rostlinách, ale také v lidském organismu. Kotvičnick zemní (*Tribulus terrestris*) představuje známou bylinu obsahující SSs, proto často slouží k výrobě doplňků stravy. SSs lze izolovat pomocí řady metod, avšak dosud nebyla vyvinuta optimalizovaná metoda jejich skríninky v rostlinném materiálu.

V rámci této práce byla optimalizována metoda SPE purifikace SSs z kotvičnicku zemního. Jako vhodná kolonka byla vybrána kolonka DPA-6S, která obsahuje polyamidovou pryskyřici pro zachycení polárních analytů. SSs se tedy na této kolonce nezachycují, ale kolonkou prochází rovnou po nanesení vzorku. Dále pak byla vyvinuta a optimalizována metoda UPLC separace SSs s následnou detekcí pomocí MS. SSs byly separovány na koloně fenyl-hexyl CSH, která vykazovala nejsymetrickější píky. Také průměrná šířka píků v základně byla na této koloně nejnižší a rozlišení koeluuujících píků tribulosinu a dioscinu dosahovalo druhé nejlepší hodnoty mezi testovanými kolonami.

Pro analýzu SSs v rostlinném materiálu byl vybrán kotvičnick zemní, jelikož je znám svým obsahem právě těchto rostlinných sekundárních metabolitů. Pro optimalizaci navážky bylo vybráno množství 2-50 mg DW. Bylo zjištěno, že se zde uplatňuje silný matriční efekt, který snižuje návratnost značených interních standardů se zvyšující se navážkou kotvičnicku a ovlivňuje tak i kvantifikaci samotných SSs. Jako optimalizovaná navážka byla tedy zvolena navážka 5 mg DW.

SSs byly analyzovány v optimalizované navážce (5 mg) dvanácti vzorků kotvičnicku zemního, které se lišily jak obsaženou rostlinnou částí, tak svým původem. Koncentrace vybraných SSs se mezi vzorky výrazně lišily, což odpovídá literatuře, ve které je uváděna závislost obsahu SSs na různých faktorech.

7 CITOVANÁ LITERATURA

- Abe I., Rohmer M., Prestwich G., 1993. Enzymatic Cyclization of Squalene and Oxidosqualene to Sterols and Triterpenes. *Chemical Reviews*, 93(6), 2189-2206.
- Abudayyak M., Jannuzzi A. T., Özhan G., Alpertunga B., 2014. Investigation on the toxic potential of *Tribulus terrestris* in vitro. *Pharmaceutical Biology*, 53(4), 469-476.
- Adão C., da Silva B., Parente J., 2011. A new steroidal saponin with antiinflammatory and antiulcerogenic properties from the bulbs of *Allium ampeloprasum* var. *porrum*. *Fitoterapia*, 82(8), 1175-1180.
- Araujo P., 2009. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B* 877, 2224–2234.
- Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M. H. A., Ghafoor K., Norulaini N. A. N., Omar A. K. M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Balandrin M., 1996. Commercial Utilization of Plant-Derived Saponins: An Overview of Medicinal, Pharmaceutical, and Industrial Applications. *Saponins Used in Traditional and Modern Medicine*, 1-14.
- Bart H., 2011. Extraction of Natural Products from Plants – An Introduction. In *Industrial Scale Natural Products Extraction*. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1-25.
- Barve K., Laddha K., Jayakumar B., 2010. Extraction of Saponins from Safed Musli. *Pharmacognosy Journal*, 2(13), 561-564.
- Batoei S., Mahboubi M., Yari R., 2016. Antibacterial activity of *Tribulus terrestris* methanol extract against clinical isolates of *Escherichia coli*. *Herba Polonica*, 62(2), 57-66.
- Böttger S., Hofmann K., Melzig M., 2012. Saponins can perturb biologic membranes and reduce the surface tension of aqueous solutions: A correlation?. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(9), 2822-2828.
- Calle J. M., Pérez A. J., Simonet A. M., Guerra J. O., Macías F. A., 2016. Steroidal Saponins from *Furcraea hexapetala* Leaves and Their Phytotoxic Activity. *Journal of Natural Products*, 79(11), 2903-2911.

- Cui J., Kang L., Zhao Y., Zhao J., Zhang J., Pang X., Yu H., Jia D., Liu Ch., Yu L., Ma B., Barchi J., 2016. Steroidal Saponins from the Rhizomes of *Aspidistra typica*. *PLOS ONE*, 11(3).
- De Geyter E., Lambert E., Geelen D., Smagghe G., 2007. Novel Advances with Plant Saponins as Natural Insecticides to Control Pest Insects. *Pest Technology*, 1(2), 96-105.
- Dinchev D., Janda B., Evstatieva L., Oleszek W., Aslani M. R., Kostova I., 2008. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. *Phytochemistry*, 69(1), 176-186.
- Dubey V., Bhalla R., Luthra R., 2003. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biosciences*, 28(5), 637-646.
- Eisenreich W., Schwarz M., Cartayrade A., Arigoni D., H Zenk M., Bacher A., 1998. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chemistry & Biology*, 1998(5).
- Ercan P., El S., 2016. Inhibitory effects of chickpea and *Tribulus terrestris* on lipase, α -amylase and α -glucosidase. *Food Chemistry*, 205, 163-169.
- Fang S., Hao Ch., Liu Z., Song F., Liu S., 1999. Application of Electrospray Ionization Mass Spectrometry Combined with Sequential Tandem Mass Spectrometry Techniques for the Profiling of Steroidal Saponin Mixture Extracted from *Tribulus terrestris*. *Planta Medica*, 65(1), 068-073.
- Foubert K., Cuyckens F., Vleeschouwer K., Theunis M., Vlietinck A., Pieters L., Apers S., 2010. Rapid quantification of 14 saponins of *Maesa lanceolata* by UPLC–MS/MS. *Talanta*, 81(4-5), 1258-1263.
- Gafni J., Munsch J. A., Lam T. H., Catlin M. C., Costa L. G., Molinski T. F., Pessah I. N., 1997. Xestospongins: Potent Membrane Permeable Blockers of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *Neuron*, 19(3), 723-733.
- Ganzera M., Bedir E., Khan I., 2001. Determination of Steroidal Saponins in *Tribulus terrestris* by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography and Evaporative Light Scattering Detection. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(11), 1752-1758.
- Genser B., Silbernagel G., De Backer G., Bruckert E., Carmena R., Chapman M. J., Deanfield J., Descamps O. S., Rietzschel E. R., Dias K. C., März W., 2012. Plant sterols and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *European Heart Journal*, 33(4), 444-451.

- Ginzberg I., Tokuhisa J., Veilleux R., 2009. Potato Steroidal Glycoalkaloids: Biosynthesis and Genetic Manipulation. *Potato Research*, 52(1), 1-15.
- Ha T. J., Lee B. W., Park K. H., Jeong S. H., Kim H.-T., Ko J.-M., Baek I.-Y., Lee J. H., 2014. Rapid characterisation and comparison of saponin profiles in the seeds of Korean Leguminous species using ultra performance liquid chromatography with photodiode array detector and electrospray ionisation/mass spectrometry (UPLC–PDA–ESI/MS) analysis. *Food Chemistry*, 146, 270-277.
- He H., Xu J., Xu Y., Zhang C., Wang H., He Y., Wang T., Yuan D., 2012. Cardioprotective effects of saponins from *Panax japonicus* on acute myocardial ischemia against oxidative stress-triggered damage and cardiac cell death in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(1), 73-82.
- Heng M. Y., Tan S. N., Yong J. H., Ong E. S., 2013. Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, 1-10.
- Hiai S., Oura H., Nakajima T., 1976. Color Reaction of Some Sapogenins and Saponins with Vanillin and Sulfuric Acid. *Planta Medica*, 29(02), 116-122.
- Chaieb I., 2010. Saponins as Insecticides: a Review. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 5(1), 39-50.
- Chan C.-H., Yusoff R., Ngoh G.-C., Kung F. W.-L., 2011. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6213-6225.
- Chen Y., Guo Z., Wang X., Qiu C., 2008. Sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 1184(1-2), 191-219.
- Chen Y., Xie M., Gong X., 2007. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 162-170.
- Cheok C., Salman H., Sulaiman R., 2014. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16-40.
- Ivanchina N.V., Malyarenko T. V., Kicha A. A., Kalinovskiy A. I., Dmitrenok P. S., Stonik V. A., 2017. A New Steroidal Glycoside Granuloside C from the Starfish *Choriaster granulatus*, Unexpectedly Combining Structural Features of Polar Steroids from Several Different Marine Invertebrate Phyla. *Natural Product Communications*, 12(10), 1585-1588.

- Iwagami S., Sawabe Y., Nakagawa T., 1992. Micellar electrokinetic chromatography for the analysis of crude drugs (III): Separation of ginsenosides in Ginseng Radix. *Shoyakugaku Zasshi*, 46, 339-347.
- Jin L., Lu T., Qin X., Ni W., Yan H., Chen Y., Liu H., He H., Liu H., 2016. Two New Highly Oxygenated Spirostanol Saponins from *Paris polyphylla* var. *stenophylla*. *Natural Products and Bioprospecting*, 6(4), 205-210.
- Kraševac I., Prosen H., 2018. Solid-Phase Extraction of Polar Benzotriazoles as Environmental Pollutants: A Review. *Molecules*, 23(10), 1-14.
- Lazarova I., Ivanova A., Mechkarova P., Peev D., Valyovska N., 2014. Intraspecific Variability of Biologically Active Compounds of Different Populations of *Tribulus Terrestris* L. (Zygophyllaceae) in South Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(2), 2352-2356.
- Lee S. T., Mitchell R. B., Wang Z., Heiss Ch., Gardner D. R., Azadi P., 2009. Isolation, Characterization, and Quantification of Steroidal Saponins in Switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2599-2604.
- Li J., Zu Y., Fu Y., Yang Y., Li S., Li Z., Wink M., 2010. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(4), 637-643.
- Li T., Zhang Z., Zhang L., Huang X., Lin J., Chen G., 2009. An improved facile method for extraction and determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by focused microwave-assisted extraction coupled with GC-MS. *Journal of Separation Science*, 32, 4167-4175.
- Liu P., Lu J., Kang L., Yu H., Zhang L., Song X., Ma B., 2012. A new C30 sterol glycoside from the fresh fruits of *Momordica charantia*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 10(2), 88-91.
- Lorent J., Quetin-Leclercq J., Mingeot-Leclercq M., 2014. The amphiphilic nature of saponins and their effects on artificial and biological membranes and potential consequences for red blood and cancer cells. *Org. Biomol. Chem*, 12(44), 8803-8822.
- Lu T., Shu T., Qin X., Ni W., Ji Y., Chen Q., Khan A., Zhao Q., Liu H., 2017. Spirostanol saponins from *Ypsilandra parviflora* induce platelet aggregation. *Steroids*, 123, 55-60.

- Marrelli M., Conforti F., Araniti F., Statti G., 2016. Effects of Saponins on Lipid Metabolism: A Review of Potential Health Benefits in the Treatment of Obesity. *Molecules*, 21(10).
- Mason T., Paniwnyk L., Lorimer J., 1996. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry* 3, 253-260.
- Moghimipour E., Handali S., 2015. Saponin: Properties, Methods of Evaluation and Applications. 5(3), 207-220.
- Moses T., Papadopoulou K., Osbourn A., 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(6), 439-462.
- Mostafa A., Sudisha J., El-Sayed M., Ito S., Ikeda T., Yamauchi N., Shigyo M., 2013. Aginoside saponin, a potent antifungal compound, and secondary metabolite analyses from *Allium nigrum* L. *Phytochemistry Letters*, 6(2), 274-280.
- Mottaleb M., Sarker S., 2012. Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation. *Natural Products Isolation*, 75-87.
- Mulinacci N., Vignolini P., la Marca G., Pieraccini G., Innocenti M., Vincieri F. F., 2003. Food Supplements of *Tribulus terrestris* L.: An HPLC-ESI-MS Method for an Estimation of the Saponin Content. *Chromatographia*, 57(9/10), 581-592.
- Netala V. R., Ghosh S. B., Bobbu P., Anitha D., Tartte V., 2014. Triterpenoid Saponins: A Review on Biosynthesis, Applications and Mechanism of Their Action. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 24-28.
- Nguyen L. T., Farcas A. C., Socaci S. A., Tofana M., Diaconeasa Z. M., Pop O. L., Salanta L. C., 2020. An Overview of Saponins – A Bioactive Group. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, 77(1), 25-36.
- Oleszek W., 2002. Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A*, 967(1), 147-162.
- Oleszek W., Bialy Z., 2006. Chromatographic determination of plant saponins – An update (2002–2005). *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 78-91.
- Osbourn A., Goss R., Field R., 2011. The saponins – polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Natural Product Reports*, 28(7).
- Patel K., Gadewar M., Tahilyani V., Patel D. K., 2012. A review on pharmacological and analytical aspects of diosgenin: a concise report. *Natural Products and Bioprospecting*, 2(2), 46-52.

- Peng Y., Yang Z., Wang Y., Liu Z., Bao J., Hong Y., 2011. Pathways for the steroidal saponins conversion to diosgenin during acid hydrolysis of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright. *Chemical Engineering Research and Design*, 89(12), 2620-2625.
- Pereira C., Meireles M., 2010. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 340-372.
- Pokrywka A., Obmiński Z., Malczewska-Lenczowska J., Fijatek Z., Turek-Lepa E., Grucza R., 2014. Insights into Supplements with *Tribulus Terrestris* used by Athletes. *Journal of Human Kinetics*, 41(1), 99-105.
- Rehan M., Shafiullah, Mir S., 2020. Structural diversity, natural sources, and pharmacological potential of plant-based saponins with special focus on anticancer activity: a review. *Medicinal Chemistry Research*, 29(10), 1707-1722.
- Sarvin B., Stekolshchikova E., Rodin I., Stavrianidi A., Shpigun O., 2018. Optimization and comparison of different techniques for complete extraction of saponins from *T. terrestris*. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 8, 75-82.
- Scott G. I., Colligan P. B., Ren B. H., Ren J., 2001. Ginsenosides Rb1 and Re decrease cardiac contraction in adult rat ventricular myocytes: role of nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*, 134(6), 1159-1165.
- Shi Y., Han B., Yu X., Qu S., Sui D., 2011. Ginsenoside Rb3 ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Pharmaceutical Biology*, 49(9), 900-906.
- Shu J., Zhu G., Huang G., Huang H., Liang Y., Liu X., Yu J., Zhou M., Li L., Deng J., 2017. New steroidal saponins with l-arabinose moiety from the rhizomes of *Smilax scobinicaulis*. *Phytochemistry Letters*, 21, 194-199.
- Singh D., Chaudhuri P., 2018. Structural characteristics, bioavailability and cardioprotective potential of saponins. *Integrative Medicine Research*, 7(1), 33-43.
- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouch S. R., 2019. Analytická chemie. *VŠCHT*.
- Soleimanpour S., Sedighinia F. S., Safipour Afshar A., Zarif R., Ghazvini K., 2015. Antibacterial activity of *Tribulus terrestris* and its synergistic effect with *Capsella bursa-pastoris* and *Glycyrrhiza glabra* against oral pathogens: an *in-vitro* study. *Avicenna J Phytomed*, 5(3), 210-217.
- Song X., Li Y., Zhang D., Jiang Y., Wang W., Song B., Tang Z., Cui J., Yue Z., 2015. Two new spirostanol saponins from the the roots and rhizomes of *Tupistra chinensis*. *Phytochemistry Letters*, 13, 6-10.

- Sovová H., Stateva R., 2011. Supercritical fluid extraction from vegetable materials. *Reviews in Chemical Engineering*, 27(3-4).
- Stavrianidi A. N., Stekolshchikova E. A., Turova P. N., Rodin I. A., Shpigun O. A., 2017. Quantitative analysis of a multicomponent system for liquid chromatography – mass spectrometry determination of diosgenin, dioscin and protodioscin in plant extracts of *Tribulus terrestris*. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 72(3), 135-143.
- Ștefănescu R., Tero-Vescan A., Negroiu A., Aurică E., Vari C., 2020. A Comprehensive Review of the Phytochemical, Pharmacological, and Toxicological Properties of *Tribulus terrestris* L. *Biomolecules*, 10(5).
- Takeuchi T. M., Pereira C. G., Braga M. E. M., Maróstica Jr. M. R., Leal P. F., Meireles M. A. A., 2009. Low-Pressure Solvent Extraction (Solid–Liquid Extraction, Microwave Assisted, and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants. In *Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications*. CRC Press, 137-218.
- Tang C., Yu Y., Qi Q., Wu X., Wang J., Tang S., 2019. Steroidal saponins from the rhizome of *Polygonatum sibiricum*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 21(3), 197-206.
- Teo C. C., Tan S. N., Yong J. W. H., Hew C. S., Ong E. S., 2008. Evaluation of the extraction efficiency of thermally labile bioactive compounds in *Gastrodia elata* Blume by pressurized hot water extraction and microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1182(1), 34-40.
- Teo C. C., Tan S. N., Yong J. W. H., Hew C. S., Ong E. S., 2009. Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Separation Science*, 32(4), 613-622.
- Verza S. G., Silveira F., Cibulski S., Kaiser S., Ferreira F., Gosmann G., Roehe P. M., Ortega G. G., 2012. Immunoadjuvant Activity, Toxicity Assays, and Determination by UPLC/Q-TOF-MS of Triterpenic Saponins from *Chenopodium quinoa* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3113-3118.
- Wang T., Choi R. C.Y., Li J., Bi C. W.C., Ran W., Chen X., Dong T. T.X., Bi K., Tsim K. W.K., 2012. Trillin, a steroidal saponin isolated from the rhizomes of *Dioscorea nipponica*, exerts protective effects against hyperlipidemia and oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(1), 214-220.
- Wang Z., Wang B., Zhao Y., Wang F., Sun Y., Guo R., Song X., Xin H., Sun X., 2016. Furostanol and Spirostanol Saponins from *Tribulus terrestris*. *Molecules*, 21(4).

- Wu J., Lin L., Chau F., 2001. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrasonics Sonochemistry*, (8), 347-352.
- Xiang L., Wang Y., Yi X., Feng J., He X., 2016b. Furospirostanol and spirostanol saponins from the rhizome of *Tupistra chinensis* and their cytotoxic and anti-inflammatory activities. *Tetrahedron*, 72(1), 134-141.
- Xiang L., Yi X., Wang Y., He X., 2016a. Antiproliferative and anti-inflammatory polyhydroxylated spirostanol saponins from *Tupistra chinensis*. *Scientific Reports*, 6(1).
- Yang B., Zhang J., Liu Y., Kuang H., 2016. Steroidal Saponins from the Rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides*. *Molecules*, 21(8).
- Yang C., Lin W., Zhao L., Cai J., 2019. A new furostanol saponin from *Dendrobium chrysanthum* Lindl. with cytotoxic activity. *Natural Product Research*, 33(17), 2461-2465.
- Yen P. H., Chi V. T. Q., Kiem P. V., Tai B. H., Quang T. H., Nhiem N. X., Anh H. L. T., Ban N. K., Thanh B. V., Minh C. V., Park S., Kim S. H., 2016. Spirostanol saponins from *Tacca vietnamensis* and their anti-inflammatory activity. , 26(15), 3780-3784.
- Zhang H., Su Y., Yang F., 2016. Three new steroidal saponins from *Helleborus thibetanus*. *Natural Product Research*, 30(15), 1724-1730.