

Dobijanje sorbenata sa potencijalnom primenom u ekstrakciji diosgenina pomoću čvrste faze

Diosgenin je steroidni sapogenin od velikog farmaceutskog značaja. Koristi se u terapijama teških oboljenja kao što su karcinomi dojke, grlića materice, prostate, pojedinih oblika leukemije, koristi se u terapiji neplodnosti. Diosgenin je i prekursor za dobijanje drugih značajnih steroidnih jedinjenja, kao što je na primer dehidroepiandrosteron, koji se koristi u terapijama Alchajmerove bolesti, lupusa, dijabetesa i mnogih drugih bolesti. U ovom radu je napravljeno 7 polimernih sorbenata koji se međusobno razlikuju po sastavu i porogenima u kojima je vršena njihova sinteza. Funkcionalni monomeri prilikom sinteza su bili metakrilna kiselina, 4-vinilpiridin i dietilaminoetil-metakrilat, a neki sorbenti su sintetisani bez funkcionalnog monomera. Umreživači su bili etilenglikol-dimetakrilat i divinilbenzen. Kao rastvarači su korišteni acetonitril i 2-propanol. Ispitivanje vezivanja diosgenina za dobijene sorbente vršeno je iz različitih smeša rastvarača. Smeše rastvarača iz kojih je ispitivano vezivanje bile su: smeše acetonitrila i vode u zapreminskim odnosima 9/1 i 8/2 i smeše metanola i vode u zapreminskim odnosima 9/1 i 8/2. Vezivanje diosgenina za dobijene sorbente poređeno je sa vezivanjem diosgenina za komercijalni sorbent – kopolimer stirena i divinilbenzena. Vezivanje diosgenina za dobijene sorbente bilo je najveće iz smeše metanola i vode u odnosu 8/2. Četiri od 7 sorbenata vezuju diosgenin više od komercijalnog sorbenta pri istim uslovima, dok najveće vezivanje pokazuje sorbent poli(divinilbenzen) koji je sintetisan u acetonitrilu – 93%.

Uvod

Diosgenin je steroidni sapogenin (struktura prikazana na slici 1), koji se dobija kao ekstrakt iz krtole biljaka porodice Dioscoreaceae. Na našem podneblju raste biljka *Trigonella foenum graecum* (narodni naziv – piskavica), koja u svom hemijskom sastavu sadrži diosgenin (Mahato *et al.* 1982).

Diosgenin ima veliki hemijski i medicinski značaj: prekursor je za dobijanje mnogih steroidnih jedinjenja poput progesterona, estrogena, testosterona, dehidroepiandrosterona (DHEA) i drugih (Waller i Yamasaki 1995). U medicini može da se koristi kao alternativa za estrogen, u lečenju neplodnosti, pomaže u lečenju osteoporoze, pomaže kod bolesti žučne kese, u lečenju reumatoidnog artritisa, itd. Utvrđeno je da diosgenin ima i pozitivno dejstvo u lečenju karcinoma (Raju i Mehta 2009). Do sada su utvrđeni pozitivni efekti u lečenju karcinoma dojke, prostate, jajnika i pojedinih oblika leukemije. Novi rezultati istraživanja o antitumorskom dejstvu diosgenina izlaze svakodnevno, zbog čega se u diosgeninu vidi veliki potencijal u budućem lečenju tumora (Moalic *et al.* 2001).

Diosgenin se inače dobija ekstrakcijom korena pojedinih divljih biljaka iz porodice Dioscoreaceae, koje rastu u Južnoj Americi i Africi. Prirodni diosgenin je veoma skup, i u našu zemlju se mora uvoziti. Delovanje i upotreba diosgenina se posle novih istraživanja sve više šire, zbog čega i potražnja za diosgeninom sve više raste, a samim tim raste i njegova cena (Bogdanović 2016).

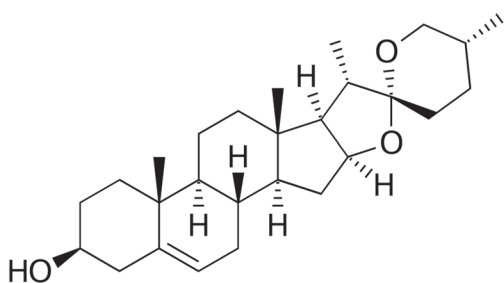
Cilj rada je sinteza polimernih sorbenata pogodnih za sorpciju diosgenina, kao i optimizacija uslova pri kojima se diosgenin najbolje vezuje za sorbent. Sintetisan sorbent se može upotrebiti pri izolovanju diosgenina iz biljke koja uspeva na našoj teritoriji.

Stefan Ugrinov (1999), Sakule, učenik 4. razreda Medicinske škole Zrenjanin

MENTORI:

Miloš Pešić, Istraživačka stanica Petnica

Miljana Todorov, Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu



Slika 1. Struktura diosgenina

Figure 1. Structure of diosgenin

Pomoću polimernih sorbenata diosgenin se može ekstrahovati i u veoma malim količinama, što je značajno jer u piskavici, biljci koja raste na našem podneblju, diosgenina ima u malim količinama, tako da bi se diosgenin mogao ekstrahovati i proizvoditi i u našoj zemlji. Dobijeni diosgenin bi bio značajno jeftiniji, ne bi se čekalo na porudžbine iz inostranstva, a biljka iz koje bi se ekstrahovao je komercijalno dostupna kod nas i proizvodi se na Institutu „Dr Josif Pančić” u Pančevu.

Polimerni sorbenti se takođe mogu upotrebljavati i za ispitivanje sadržaja diosgenina u lekovima u kojima se on nalazi kao jedan od aktivnih principa, kao i prilikom drugih ispitivanja sadržaja diosgenina.

Materijal i metode

1. Sinteza polimernih sorbenata – sintetisano je 8 polimernih sorbenata različitog hemijskog sastava (Huck i Bonn 2000).

2. Određivanje rastvarača i ispitivanje vezivanja diosgenina za polimerni sorbent – ispitivanje je vršeno za 8 sintetisanih sorbenata i poređeno je sa vezivanjem diosgenina za komercijalno dostupni polimerni sorbent – kopolimer stirena i divinilbenzena. Ispitivanje je rađeno sa rastvorom diosgenina u različitim rastvaračima, kako bi se utvrdilo iz kog rastvarača se postiže najbolje vezivanje.

3. Visoko efikasna tečna hromatografija (HPLC) – pravljenje metode za analizu uzoraka diosgenina nakon ispitivanja vezivanja za polimerni sorbent.

Sinteza polimernog sorbenta (opšti postupak). U staklenu vijalicu zapremine 10 mL doda se rastvarač u kome se vrši polimerizacija – porogen, umreživač i funkcionalni monomer, nakon čega se smeša homogenizuje u ultrazvučnom kupatilu. Iz homogene smeše ukloni se kiseonik, uvođenjem argona u reakcionu smešu i sud u toku 5 minuta. Nakon stvaranja inertne atmosfere za polimerizaciju, smeši se doda inicijator polimerizacije – azobisisobutironitril (AIBN). Staklena vijalica se zatvori i dodatno osigura parafilmom, kako bi se osigurala inertnost atmosfere reakcionog suda. Reakciona smeša se postavlja u uljano kupatilo na 65°C i polimerizacija traje 16 h.

Nakon završene polimerizacije staklena vijalica se lomi, sintetisani polimer se usitnjava u avanu sa tučkom. Usitnjeni polimerni sorbent se ispira kako bi se uklonili neizreagovali reaktanti i eventualne nečistoće.

Ispiranje se vrši tako što se usitnjeni polimer prenese u plastične kivete od 15 mL i doda 10 mL metanola. Smeša polimera i metanola se mučka 10 minuta na rotatoru, nakon čega se smeša centrifugira na 10 500 rpm tokom 10 minuta. Posle centrifugiranja odvoji se supernatantni rastvor i procedura se ponovi još četiri puta. Nakon poslednjeg ispiranja polimer se prenese na sahatno staklo i ostavlja se da se suši preko noći na sobnoj temperaturi.

Sintetisano je 7 polimernih sorbenata koji se međusobno razlikuju po hemijskom sastavu i rastvaračima u kojima je vršena njihova sinteza. Hemijski sastav sintetisanih polimernih sorbenata i rastvarači u kojima je vršena polimerizacij prikazani su u tabeli 1. Funkcionalni monomeri prilikom sinteza su bili metakrilna kiselina (MAA), 4-vinil-piridin (4-VP), 2-(dimetilamino)etil metakrilat (DAEM), a pojedini sorbenti su sintetisani bez funkcionalnog monomera. Umreživači su bili etilenglikol-dimetakrilat (EGDMA) i divinilbenzen (DVB). Kao rastvarači su korišteni acetonitril i 2-propanol (Fontanals *et al.* 2003).

Odabir rastvarača i ispitivanje vezivanja diosgenina za sintetisane sorbente (opšti postupak). U ependorf zapremine 1.5 mL izmeri se 30 mg polimernog sorbenta i doda 300 μ L rastvora diosgenina koncentracije 10^{-4} M. Rastvor diosgenina se priprema u različitim smešama rastvarača kako bi se utvrdila smeša iz koje se postiže najveće vezivanje diosgenina za

Tabela 1. Hemijski sastav sintetisanih sorbenata

Oznaka polimera	Funkcionalni monomer	Umreživač	Rastvarač
P1	–	EGDMA	2-propanol
P2	DAEM	EGDMA	acetonitril
P3	DAEM	EGDMA	2-propanol
P4	–	EGDMA	acetonitril
P5	MAA	DVB	acetonitril
P6	4-VP	DVB	acetonitril
P7	–	DVB	acetonitril

polimerni sorbent. Smeše rastvarača iz kojih je ispitivano vezivanje bile su: smeše acetonitrila i vode u zapreminskim odnosima 9/1 i 8/2 i smeše metanola i vode u zapreminskim odnosima 9/1 i 8/2. Za sve sintetisane sorbenata kao i za komercijalno dostupni sorbent vršena su po dva ispitivanja sa svakim od rastvarača diosgenina.

Ependorf sa polimernim sorbentom i rastvorom diosgenina mučka se na rotatoru tokom 2 h, nakon čega se smeša centrifugira u minicentrifugi na 15000 rpm, nakon centrifugiranja supernatantni rastvor se prenese u ependorf zapremine 0.5 mL i postupak centrifugiranja se ponovi. Po završetku centrifugiranja supernatantni rastvor se prenese u staklenu vijalicu za analizu HPLC-om, kako bi se utvrdila koncentracija diosgenina zaostalog u rastvoru nakon ispitivanja vezivanja i kako bi se ta koncentracija uporedila sa početnom koncentracijom rastvarača diosgenina.

Metoda HPLC analize. Uređaj koji je korišten za hromatografiju jeste HPLC hromatograf – Agilent Technologist 1260 Infinity, sa UV detektorom (DAD) – Agilent Technologist 1260. Eluiranje je vršeno izokratski, korišćena mobilna faza je bila smeša acetonitril/voda u

odnosu 85/15 (V/V) sa protokom mobilne faze od 1 mL/min; zapremina injektovanog uzorka bila je 5 μ L, a detekcija je vršena na 200 nm. Temperatura kolone bila je 25°C, a retenciono vreme za diosgenin, pri ovoj metodi iznosilo je oko 1.35 minuta.

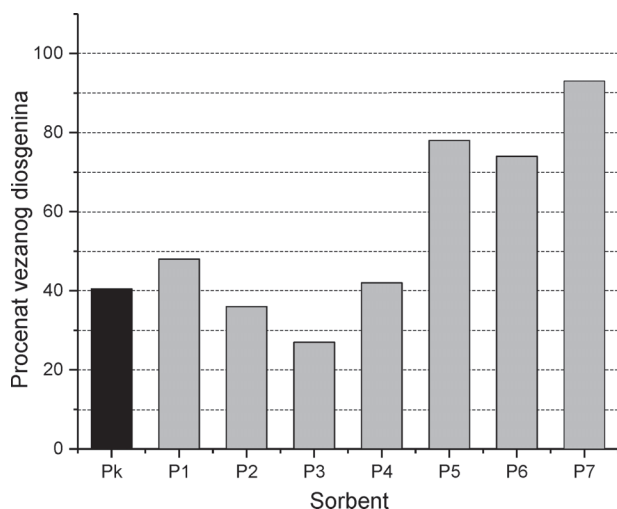
Rezultati i diskusija

Odabir rastvarača. Za ispitivanje vezivanja diosgenina, neophodan je rastvarač koji veoma dobro rastvara diosgenin, u ovom slučaju to su bili metanol i acetonitril. Između polimernog sorbenta i molekula diosgenina javljaju se gotovo isključivo nepolarne interakcije, koje se prilikom vezivanja mogu pospešiti dodatkom polarnošču rastvarača, što se postiže dodatkom male količine vode. Prilikom određivanja odnosa rastvarača i vode vodilo se računa da ne dođe do taloženja diosgenina usled smanjene rastvorljivosti prouzrokovane dodatkom vode, što bi dovelo do taloženja diosgenina, a ne do vezivanja za sorbent.

Ispitivano je vezivanje diosgenina iz četiri smeše rastvarača, rezultati vezivanja prikazane su u tabeli 2. Smeša rastvarača iz kojih

Tabela 2. Rezultati vezivanja diosgenina iz različitih smeša rastvarača (%)

	ACN/H ₂ O = 9/1	ACN/H ₂ O = 8/2	MeOH/H ₂ O = 9/1	MeOH/H ₂ O = 8/2
P1	0	6	6	48
P2	1	13	17	36
P3	6	11	8	27
P4	8	13	20	42
P5	20	32	38	78
P6	16	21	35	74
P7	9	52	67	93



Slika 2. Procenat vezanog diosgenina iz metanola/vode 8/2 (0.1 mM) za sorbente

Figure 2. Percentage of bound diosgenin from methanol/water 8/2 solution (0.1 mM) to sorbents

je postignuto najbolje vezivanje diosgenina za polimerni sorbent, jeste smeša metanola i vode u zapreminskom odnosu 8/2. Imajući u vidu da je vezivanje najveće u najmanje polarnom rastvaraču, može se zaključiti da su interakcije između diosgenina i polimera pre svega hidrofobne interakcije, što je i bila početna hipoteza. Pokazano je da je vezivanje diosgenina za sorbente iz smeše acetonitrila i vode mnogo manje nego iz smeša metanol/voda.

Rezultati vezivanja diosgenina za sintetisane polimerne sorbente (P1-P7), kao i rezultat vezivanja diosgenina za komercijalno dostupni sorbent (Pk – Amberlite XAD7) prikazani su na slici 1. Iz tabele 2 se može uočiti da 4 od 7 sintetisanih sorbenata vezuju diosgenin u većoj meri u odnosu na komercijalni sorbent. Najviše diosgenina u poređenju sa svim ostalim sorbentima vezuje sorbent P7, koji je vezao 93% diosgenina od ukupne količine diosgenina u početnom rastvoru.

Zaključak

Sintetisano je 7 polimernih sorbenata slobodno-radikalnom polimerizacijom. Sintetisani sorbenti su kopolimeri etilenglikol-dimetakrilata ili divinilbenzena sa nekoliko funkcionalnih monomera (metakrilna kiselina, 4-vinilpiridin i dietilaminoetil-metakrilat). Ispitano je vezivanje diosgenina za dobijene polimere iz smeša metanola i vode kao i acetonitrila i vode u zapreminskim odnosima 9/1 i 8/2. Pokazano je da je za sorpciju diosgenina najbolje primeniti smešu

metanola i vode u odnosu 8/2. Najviše diosgenina vezao je homopolimer divinilbenzena sintetisan u acetonitrilu (P7) i to čak 93% iz rastvora diosgenina koncentracije 0.1 mM u smeši metanola i vode 8/2. Veće vezivanje diosgenina od komercijalnog sorbenta pokazuju i ostali polimeri koji u svom sastavu imaju divinilbenzen (P5 i P6) kao i homopolimer etilenglikol-dimetakrilata (P1), 78, 74 i 48%, respektivno.

Literatura

- Mahato S. B., Ganguly A. N., Sahu N. P. 1982. Steroid Saponins. *Phytochemistry*, **21** (5): 959.
- Waller G., Yamasaki K. (ed.) 1995. *Saponins used in traditional and modern medicine*. Springer
- Moalic S., Liagre B., Corbiere C., Bianchi A., Dauça M., Bordji K., Beneytout J. 2001. A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. *FEBS Letters*, **506**: 225.
- Raju J., Mehta R. 2009. Cancer Chemopreventive and Therapeutic Effects of Diosgenin, a Food Saponin. *Nutrition and Cancer*, **61**: 27.
- Bogdanović M. A. 2016. Dobijanje, karakterizacija i optimizacija hipolipemijskih ekstrakata matičnjaka (*Melissa officinalis*) i grčkog semena (*Trigonella foenum-graecum*) natkritičnim ugljenik (IV)-oksidom. doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Karnegijeva 4, 11000 Beograd

Huck C., Bonn G. 2000. Recent developments in polymer-based sorbents for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, **885**: 51.

Fontanals N., Marcé R. M., Galia M., Borrull F. 2003. Preparation and characterization of highly polar polymeric sorbents from styrene-divinylbenzene and vinylpyridine-divinylbenzene for the solid-phase extraction of polar organic pollutants. *Journal of polymer science*, **41**: 1927.

Stefan Ugrinov

Obtaining Sorbents with a Potential Application in Solid-Phase Extraction of Diosgenin

Diosgenin is a steroid sapogenin of great pharmaceutical significance. It is used in therapies of many serious diseases such as breast cancer, cervical cancer, prostate cancer, certain forms of leukemia, as well as infertility therapy. Also, diosgenin is a precursor for the production of other significant steroidal compounds such as dehydroepiandrosterone used in therapies of Alzheimer's disease, diabetes, lupus and many more diseases. In this study, 7 polymeric sorbents were made which differed by composi-

tion and the porogens used in their synthesis. The functional monomers during synthesis were methacrylic acid, 4-vinylpyridine, diethylaminoethyl-methacrylate. Some of the sorbents were synthesized without functional monomers. Crosslinkers during synthesis were ethylene glycol dimethacrylate and divinylbenzene. As a porogen acetonitrile and 2-propanol were used. Diosgenin binding assays for the obtained sorbents were carried out in a mixture of acetonitrile and water in 9/1 and 8/2 solvent ratios and in a mixture of methanol and water in 9/1 and 8/2 solvent ratios. Diosgenin binding to the obtained sorbents was compared with diosgenin binding to the commercial sorbent – poly(styrene-co-divinylbenzene). Binding to the obtained sorbents was the highest from the mixture of methanol and water in a 8/2 solvent ratio. Four of the 7 sorbents bind diosgenin better than commercial sorbent under the same conditions, while the highest binding is achieved by the sorbent of poly(divinylbenzene) which was synthesized in acetonitrile – 93%.

Diosgenin binding sorbents could potentially be used in the extraction of diosgenin from different plant species containing diosgenin. Also, they could be used in the analysis of drugs with diosgenin. The results of this study opens the space for the optimization of the conditions of solid-phase extraction with poly(divinylbenzene) as the solid sorbent. 