

## Sposób oczyszczania diadinoksantyny

Przedmiotem wynalazku jest procedura izolacji i oczyszczania diadinoksantyny składająca się z pięciu etapów, takich jak: hodowla okrzemek, ekstrakcja barwników, frakcjonowanie barwników, alkalizacja złoza do chromatografii oraz chromatografia kolumnowa, których prowadzenie w warunkach zgodnych z wynalazkiem pozwala na uzyskanie diadinoksantyny o wysokim stopniu czystości.

Chromatografia kolumnowa jest najbardziej cenioną metodą preparatywną i jedyną mającą zastosowanie przemysłowe, co więcej nie wymaga użycia kosztownej aparatury ani specjalistów uprawnionych do wykonania procedury. Alternatywnie, może być stosowana chromatografia cienkowarstwowa (TLC), jednakże jest ona jedynie metodą analityczną i nie pozwala na użycie przemysłowe. Coraz częściej istnieje konieczność używania techniki HPLC do pozyskania czystych preparatów, jednak skala takiej produkcji jest nieporównywalnie mniejsza i o wiele bardziej kosztowna.

W celu obniżenia kosztów produkcji często stosuje się syntetyzowane chemicznie zamienniki substancji naturalnych. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że ich przyswajalność oraz działanie biologiczne są w znacznym stopniu ograniczone. Producenci z branży karotenoidowej widzą przyszłość w pozyskiwaniu naturalnych barwników z mikroorganizmów morskich. Można je bowiem hodować w bioreaktorach na skalę przemysłową, a koszty izolacji mogą być niższe od drogich syntez chemicznych. Karotenoidy cieszą się ogromnym zainteresowaniem na rynku medycznym, kosmetycznym i spożywczym. Ich właściwości antyoksydacyjne, zdolność do usuwania wolnych rodników, a także zapobieganie uszkodzeniom DNA stwarzają możliwość wykorzystania w produktach farmaceutycznych, suplementach diety, wysokiej jakości kosmetykach aktywnych biologicznie, a także jako dodatku do żywności podnoszącego jej wartość odżywczą. W ostatnich latach opublikowano szereg prac dokumentujących możliwość stosowania technologii liposomowej enkapsulacji karotenoidów pozwalającej zarówno na ochronę przed degradacją jak i zwiększenie ich przyswajalności.

Diadinoksantyna jest jednym z pożądaných barwników karotenoidowych.

Celem wynalazku jest dostarczenie nadającego się do stosowania w skali przemysłowej sposobu otrzymywania diadinoksantyny o stopniu czystości  $\geq 99\%$ .

Cel ten został osiągnięty w sposobie według wynalazku scharakteryzowanym w załączonych zastrzeżeniach patentowych.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania diadinoksatyny charakteryzujący się tym, że: a) prowadzi się hodowlę okrzemek, zwłaszcza gatunku *Phaeodactylum tricorutum*, przy intensywności światła  $100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  i fotoperiodzie światło/ciemność wynoszącym 16h/8h, korzystnie do uzyskania hodowli o gęstości  $2 \cdot 10^6$  komórek/ml, a następnie przenosi się hodowlę do ciemności na 15-20 h, oraz oddziela się komórki okrzemek,

b) z uzyskanych komórek prowadzi się ekstrakcję barwników w mieszaninie ekstrakcyjnej składającej się ze składnika A i składnika B w stosunku objętościowym 9:1, przy czym jako składnik A stosuje się mieszaninę metanolu z 0,2 M octanem amonu w proporcjach objętościowych 9:1, natomiast jako składnik B stosuje się octan etylu, przy czym mieszaninę ekstrakcyjną stosuje się w ilości 10 ml na  $2 \cdot 10^9$  komórek, a następnie odwirowuje się i oddziela się uzyskany nadsącz,

c) wykonuje się wstępne oczyszczanie poprzez frakcjonowanie barwników zawartych w nadsączu uzyskanym w etapie b), przy czym frakcjonowanie prowadzi się w mieszaninie składającej się ze składnika A, składnika B oraz składnika C w stosunku objętościowym 4:1:2, przy czym jako składnik A stosuje się mieszaninę heksanu z eterem dietylowym w proporcjach objętościowych 1:1, jako składnik B stosuje się benzynę ekstrakcyjną, a jako składnik C stosuje się wodę, przy czym jako frakcję zawierającą karotenoidy zbiera się frakcję o mniejszej gęstości,

d) przygotowuje się kolumnę chromatograficzną, przy czym jako złożę chromatograficzne stosuje się złożę krzemionkowe o pH=9, alkalizowane w szczególności wodorowęglanem sodu, zrównoważone następnie mieszaniną składającą się z heksanu i acetonu w proporcjach objętościowych 90:10,

e) prowadzi się rozdział mieszaniny barwników uzyskanej w etapie c) na kolumnie uzyskanej w etapie d), przy czym mieszaninę barwników uzyskaną z  $2 \cdot 10^9$  komórek nanosi się na 20 g złoża, przy czym mieszaninę barwników rozpuszcza się w mieszaninie składającej się z heksanu i acetonu w proporcjach objętościowych 90:10, a następnie prowadzi się elucję mieszaniną składającą się z heksanu i acetonu w proporcjach objętościowych od 90:10 do 70:30, przy czym jako frakcję zawierającą diadinoksatynę zbiera się czwartą frakcję barwników schodzącą z kolumny, korzystnie ulegającą elucji przy zastosowaniu mieszaniny heksan:aceton w proporcjach objętościowych 70:30.

Korzystnie, etap a) prowadzi się w temperaturze od 15 do  $20^{\circ}\text{C}$ , korzystnie  $15^{\circ}\text{C}$ .

Korzystnie, w etapie a) komórki okrzemek oddziela się poprzez wirowanie przy 5500xg w temp. 4°C przez 5 min.

Korzystnie, nadsącz uzyskany w etapie b) zagęszcza się poprzez odparowanie w atmosferze beztlenowej, zwłaszcza atmosferze azotu. Można też stosować inne metody odparowywania, istotne jest jedynie uniknięcie obecności tlenu.

Korzystnie, frakcję zawierającą karotenoidy uzyskaną w etapie c) dodatkowo przemywa się wodą destylowaną.

Korzystnie, frakcjonowanie w etapie c) powtarza się kilkukrotnie, a uzyskaną frakcję zawierającą karotenoidy zagęszcza się poprzez odparowanie w atmosferze beztlenowej, zwłaszcza atmosferze azotu. Można też stosować inne metody odparowywania, istotne jest jedynie uniknięcie obecności tlenu.

Korzystnie, w etapie d) stosuje się złożę krzemionkowe o masie 60 g/mol, rozmiarze cząstek 0.040-0.063 mm, usieciowaniu 230-400.

Korzystnie, w etapie e) elucję mieszaniną składającą się z heksanu i acetonu w proporcjach objętościowych 90:10 prowadzi się do momentu zebrania pierwszej frakcji schodzącej z kolumny.

Korzystnie, w etapie e) elucję mieszaniną składającą się z heksanu i acetonu w proporcjach objętościowych 80:20 prowadzi się od momentu zejścia z kolumny pierwszej frakcji do momentu zebrania drugiej oraz trzeciej frakcji schodzącej z kolumny.

Korzystnie, w etapie e) elucję mieszaniną składającą się z heksanu i acetonu w proporcjach objętościowych 70:30 prowadzi się od momentu zejścia z kolumny trzeciej frakcji do momentu zebrania czwartej frakcji schodzącej z kolumny.

Korzystnie, w etapie e) elucję acetonem prowadzi się od momentu zejścia z kolumny czwartej frakcji do momentu zebrania piątej frakcji schodzącej z kolumny i oczyszczenia złoża.

Korzystnie, uzyskaną w etapie e) frakcję zawierającą oczyszczoną diadinoksantynę odparowuje się w atmosferze azotu i przechowuje w temperaturze -80°C chroniąc przed światłem.

Sposób według wynalazku pozwala na uzyskanie około 50 µg diadinoksantyny o stopniu czystości  $\geq 99\%$  z  $2 \times 10^9$  komórek okrzemek w czasie 22 godzin.

Opisana procedura izolacji i oczyszczania diadinoksantyny jest jak dotąd jedyną pozwalającą na pozyskanie barwnika o bardzo wysokim stopniu czystości ( $\geq 99\%$ ), możliwą do przeprowadzenia w skali przemysłowej. Ogromnym jej atutem jest niski koszt produkcji i

krótki czas realizacji. Począwszy od wirowania hodowli okrzemek do uzyskania czystego barwnika czas przeprowadzenia procedury wynosi około 22 godziny.

Dla lepszego wyjaśnienia istoty wynalazku niniejszy opis został uzupełniony następującymi rysunkami:

Ryc. 1: Przykładowy chromatogram HPLC ekstraktu barwników z okrzemek hodowanych stale w świetle białym o intensywności  $1250 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Hodowlę testowano przez 7 dni. Zawartość diadinoksantyny (pik o czasie retencji 10.420 min.) w tych warunkach wynosiła około 15% jednak każdorazowo stwierdzono obecność zarówno izomeru diadinoksantyny (widoczny jako prawostronna asymetria piku o czasie retencji 10.420 min.) jak i barwników cyklu wiolaksantynowego (piki o czasach retencji 9.366, 11.155 oraz 12.782 min).

Ryc. 2. Przykładowy chromatogram HPLC ekstraktu barwników z okrzemek hodowanych w świetle białym o intensywności  $700 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  w fotoperiodzie 6/18 h (dzień/noc). Hodowlę testowano przez 7 dni. Zawartość diadinoksantyny (pik o czasie retencji 10.224 min.) w tych warunkach wynosiła około 18% jednak każdorazowo stwierdzono obecność izomeru diadinoksantyny (widoczny jako prawostronna asymetria piku o czasie retencji 10.224 min.).

Ryc.3. Przykładowy chromatogram HPLC ekstraktu barwników z okrzemek hodowanych w świetle białym o intensywności  $100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  w fotoperiodzie 16/8 h (dzień/noc) i przeniesionych do ciemności na 15 h. Zawartość diadinoksantyny (pik o czasie retencji 10.095 min.) w tych warunkach wynosiła około 8%, przy czym nie stwierdzono obecności ani izomeru diadinoksantyny ani barwników cyklu wiolaksantynowego.

Ryc.4. Etapy frakcjonowania barwników: (A) zmydlony ekstrakt barwników po dodaniu mieszaniny heksan:eter dietylowy (1:1 obj./obj.) – brak rozdziału frakcji; (B) zmydlony ekstrakt barwników po dodaniu mieszaniny heksan:eter dietylowy (1:1 obj./obj.) oraz benzyny ekstrakcyjnej – niewyraźny rozdział frakcji; (C) zmydlony ekstrakt barwników po dodaniu mieszaniny heksan:eter dietylowy (1:1 obj./obj.), benzyny ekstrakcyjnej oraz wody – bardzo wyraźny rozdział frakcji; (D) zebrane frakcje karotenoidowe po procesie rozdzielania frakcji – widoczna mętność roztworu; (E) przemywanie frakcji karotenoidowej wodą w celu usunięcia polarnych związków nie mających charakteru barwnikowego; (F) frakcja karotenoidowa po drugim przemywaniu wodą – klarowny roztwór; biały kolor na zdjęciach odpowiada żółtej frakcji karotenoidowej zaś ciemny odcień na zdjęciach A, B, C odpowiada zielonej frakcji chlorofilowej.

Ryc.5: Przykładowy chromatogram (po lewej) analizy HPLC-DAD wraz z widmem absorpcji (po prawej) potwierdzający czystość uzyskanego preparatu.

Przykład 1. Hodowla okrzemek.

Hodowlę *P. tricorutum* prowadzi się w warunkach sterylnych, w pożywce f/2-Si (Guillard, 1975) przygotowanej z wody morskiej wzbogaconej o substancje nieorganiczne oraz witaminy [Tabela. 1]. Hodowla prowadzona była w komorze hodowlanej w temperaturze 15°C w świetle białym o intensywności 100  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  w fotoperiodzie 16/8h (światło/ciemność). Podczas logarytmicznej fazy wzrostu doprowadzono 1 litr hodowli do gęstości  $2 \cdot 10^6$  komórek/ml. Następnie przenoszono hodowlę do ciemności na 15-20 h.

Tabela 1. Składniki pożywki f/2-Si do hodowli *Phaeodactylum tricorutum* (Guillard, 1975).

Składnik pożywki	Stężenie w roztworze wyjściowym	Stężenie w pożywce
Sól morską*	-	1.6%
NaNO <sub>3</sub>	-	0.882 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	0.036 mM
<i>Witaminy:</i>		
Cyjanokobalamina	0.3 $\mu\text{M}$	0.3 nM
Chlorowodorek tiaminy	296.4 $\mu\text{M}$	296.4 nM
Biotyna	2.0 $\mu\text{M}$	2.0 nM
<i>Mikroelementy:</i>		
Na <sub>2</sub> EDTA	12.372 mM	12.372 $\mu\text{M}$
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	11.654 mM	11.654 $\mu\text{M}$
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.040 mM	0.040 $\mu\text{M}$
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.077 mM	0.077 $\mu\text{M}$
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.042 mM	0.042 $\mu\text{M}$
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.910 mM	0.910 $\mu\text{M}$
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.024 mM	0.024 $\mu\text{M}$

\*Zastosowano sól morską Tropic Marin BIO-ACTIF SEA SALT

Wykorzystana pożywka f/2 jest standardowym medium do hodowli glonów morskich. Jednym z jej składników jest krzemian sodu niezbędny w hodowli większości okrzemek. Jednak *Phaeodactylum tricorutum* jest gatunkiem nie wymagającym obecności krzemu, który ponadto utrudnia ekstrakcję barwników, przez co należałoby dodatkowo homogenizować komórki mechanicznie. W przykładowej realizacji, *Phaeodactylum tricorutum* hodowano bez użycia krzemianu sodu. Objętość płynnej hodowli nie powinna przekraczać połowy objętości naczynia, gdyż pogorszenie warunków tlenowych osłabia

tempo wzrostu komórek. W celu uzyskania każdorazowo tej samej ilości materiału do izolacji o pożądanym składzie barwnikowym okrzemki powinny znajdować się w logarytmicznej fazie wzrostu przy zachowaniu gęstości nie większej niż  $2 \cdot 10^6$  komórek/ml. Przeszczepianie okrzemek do nowej pożywki co 3-4 dni gwarantuje ich wysoką żywotność. Jako najbardziej wiarygodną metodę oceny jakości hodowli należałoby uznać mikroskopowe zliczanie komórek. W korzystnej realizacji mogą być stosowane warunki temperaturowe w zakresie 15-20°C. Warunki świetlne mają kluczowe znaczenie dla procesu, którego celem jest uzyskanie komórek o możliwie największej zawartości diadinoksantyny przy jednoczesnym ograniczeniu obecności barwników i izomerów uniemożliwiających uzyskanie czystego preparatu. Stres świetlny indukuje wzrost zawartości barwników cyklu diadinoksantynowego, w tym diadinoksantyny. W związku z tym testowano naświetlanie komórek zarówno światłem o dużej intensywności ( $1250 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) jak i o niższej intensywności ( $700 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), po czym przenoszono do ciemności celem konwersji diatoksantyny do diadinoksantyny. Rezultatem tych eksperymentów było znaczne zwiększenie zawartości diadinoksantyny w komórkach jednak równocześnie stwierdzono obecność dodatkowych barwników oraz izomerów [Ryc.1, 2], które uniemożliwiają pozyskanie czystego preparatu. W związku z tym wybrane warunki hodowli, tj. światło o intensywności  $100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  w fotoperiodzie 16/8h (dzień/noc) umożliwiają nieznaczne podwyższenie zawartości diadinoksantyny względem warunków typowych (około  $40 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) jednak nie powodują powstawania niepożądanych barwników i izomerów [Ryc. 3], co daje gwarancję uzyskania czystego preparatu.

#### Przykład 2. Ekstrakcja barwników

Wirowano 1 L hodowli okrzemek przy 5500xg w temp. 4°C przez 5 min. Zawieszano osad w 20 ml buforu PBS o pH=7 i ponownie wirowano przy takich samych parametrach. Uzyskany osad zamrażano w ciekłym azocie. Ekstrakcję barwników wykonywano poprzez dodanie mieszaniny ekstrakcyjnej A:B (9:1 obj./obj.); A: metanol z dodatkiem 0.2 M octanu amonu (9:1 obj./obj.), B: octan etylu, do osadu w proporcji 10 ml mieszaniny do  $2 \cdot 10^9$  komórek. Intensywnie wytrząsano 2 x 10 s, a następnie wirowano przy 14000xg w temp. 4°C przez 4 min. Zbierano nadsącz i odparowywano w atmosferze azotu.

Dla uzyskania pożądanego efektu istotne jest dobranie odpowiedniej objętości mieszaniny ekstrakcyjnej do liczby komórek ponieważ wpływa to na wydajność procesu ekstrakcji. Zmniejszenie objętości mieszaniny względem liczby komórek skutkuje zmniejszeniem ilości pozyskanych barwników, w tym diadinoksantyny. Zwiększenie tej objętości nie zwiększa

wydajności ekstrakcji, a jedynie podnosi koszt procesu i wydłuża czas odparowywania składników mieszaniny. Rodzaj mieszaniny ekstrakcyjnej ma bardzo istotny wpływ na efektywność procesu. Abele i wsp. (2012) wykazali, że taka właśnie mieszanina, w przeciwieństwie do acetonu czy metanolu, pozwala na wydajną ekstrakcję ksantofili i ograniczoną ekstrakcję chlorofili i  $\beta$ -karotenu, co jest pożądanym efektem. Dodatkowo obecność jonów amonowych przeciwdziała izomeryzacji. Podczas prowadzenia testów sposobu ekstrakcji barwników wykazano, że dodatkowa homogenizacja komórek za pomocą szklanych kulek nie zwiększa wydajności procesu. Ponowna ekstrakcja barwników z osadu powstałego po pierwszej ekstrakcji również nie skutkuje zwiększeniem wydajności tego etapu.

Przykład 3. Frakcjonowanie barwników.

Prowadzi się reakcję zmydlania poprzez rozpuszczenie osadu uzyskanego w przykładzie 2 w 35 ml 95% etanolu, dodanie 3,5 ml 60% KOH, delikatne mieszanie przez dobę w temperaturze 4°C. Następnie rozdziela się frakcję chlorofilową od karotenoidowej poprzez:

- 1) dodanie do mieszaniny barwników stopniowo: 40 ml mieszaniny heksan:eter dietylowy (1:1 obj./obj.), 10 ml benzyny ekstrakcyjnej oraz 20 ml wody destylowanej; delikatne wymieszanie składników i pozostawienie do rozdzielenia się faz; zebranie górnej frakcji karotenoidowej;
- 2) do pozostałej frakcji chlorofilowej dodanie 10 ml mieszaniny heksan:eter dietylowy (1:1 obj./obj.), 2,5 ml benzyny ekstrakcyjnej i 5 ml wody destylowanej; ponowne wymieszanie składników i pozostawienie do rozdzielenia się faz; zebranie frakcji karotenoidowej;
- 3) powtórzenie etapu oznaczonego „2)” w celu zwiększenia wydajności procedury.

W korzystnej realizacji wykonuje się dodatkowe przemywanie uzyskanej frakcji karotenoidowej. W tym celu do zebranych i połączonych ze sobą frakcji karotenoidowych dodaje się wody destylowanej w proporcji 1:1 obj./obj.; intensywnie miesza, odstawia się do rozdzielenia faz i zbiera się górną frakcję karotenoidową. Przemywanie wykonywano dwukrotnie. Następnie odparowywano mieszaninę barwników w atmosferze azotu.

Reakcja zmydlania jest stosowana w procedurze izolacji barwników fotosyntetycznych w celu usunięcia związków o charakterze lipidowym. Frakcjonowanie barwników zmydlonego ekstraktu pozwala na usunięcie chlorofili stanowiących ponad 30% barwników zawartych w mieszaninie. Dla właściwego przeprowadzenia frakcjonowania barwników istotny jest dobór odpowiednich rozpuszczalników organicznych i ich zastosowanie w odpowiednich proporcjach tak, aby uzyskać frakcję (górną) zawierającą jak największą ilość diadinoxantyny z równoczesnym wyeliminowaniem obecności powstałych w wyniku

zastosowania KOH mydeł. Używana do frakcjonowania barwników fotosyntetycznych roślin wyższych i glonów mieszanina heksan: eter dietylowy (1:1 obj./obj.), w przypadku izolacji diadinokszantyny nie prowadzi do rozdziału faz [Ryc. 4A]. Dodatek benzyny prowadzi do częściowego rozdziału faz jednak ich granica jest słabo widoczna [Ryc. 4B]. Dopiero dodanie wody jako czwartego składnika pozwala uzyskać dwie dobrze rozdzielone frakcje [Ryc. 4C], przy czym diadinokszantyna preferencyjnie rozpuszcza się w fazie górnej. Ponowne, dwukrotne przemywanie frakcji dolnej poprzez dodanie 10 ml mieszaniny heksan:eter dietylowy (1:1 obj./obj.), 2,5 ml benzyny ekstrakcyjnej i 5 ml wody destylowanej pozwala efektywnie przeprowadzić całą dostępną pulę diadinokszantyny do frakcji górnej. Zwiększenie liczby powtórzeń wpływa niekorzystnie na proces ponieważ nie zwiększa ilości diadinokszantyny ale powoduje wzrost zawartości fukokszantyny w uzyskanej frakcji karotenoidowej. Przeprowadzenie frakcjonowania barwników jest istotne dla dalszego oczyszczania, ponieważ pozwala na usunięcie chlorofili, a także znacznej ilości fukokszantyny. Pominięcie tego etapu uniemożliwia uzyskanie czystej diadinokszantyny.

Przykład 4. Przygotowanie kolumny chromatograficznej.

Złoże krzemionkowe (Merck, Silica gel 60 (0.040-0.063 mm)) zalkalizowano zgodnie z procedurą znaną z Nagy i wsp., 2009. W tym celu 200 g złoży dodano do 2 L nasyconego roztworu wodorowęglanu sodu i mieszano przez 2 h w temperaturze pokojowej. Filtrację złoży przeprowadzono na bibule filtracyjnej w lejku Buchnera za pomocą pompy próżniowej. Po przesączeniu roztworu węglanu sodu złoże przemywano dodając stopniowo 2 L wody destylowanej, a następnie 500 ml acetonu. Złoże osuszano pod dygestorium przez 24 h. Uzyskane w ten sposób złoże (20 g) nałożono w mieszaninie heksan:aceton (90:10 obj./obj.) na kolumnę szklaną o średnicy 2 cm i długości co najmniej 30 cm.

Stosowanie alkalicznego złoży uniemożliwia powstawanie izomeru *cis* podczas chromatografii, nie daje to jednak gwarancji efektywnego rozdziału. Aby uzyskać diadinokszantynę o czystości  $\geq 99\%$  należy przestrzegać warunków rozdziału opisanych poniżej. Istotnym elementem efektywnej chromatografii jest również proporcja barwników do złoży, tzn. karotenoidowa część ekstraktu z  $2 \cdot 10^9$  komórek powinna być nałożona na 20 g złoży krzemionkowego. Zmniejszenie ilości złoży spowoduje przeładowanie kolumny co skutkuje tym, że efektywne rozdzielanie barwników nie jest możliwe, zaś zwiększenie nie jest ekonomiczne - nie poprawia efektywności rozdziału a co więcej wydłuża jego czas trwania. Średnica kolumny znacząco wpływa na proces rozdziału, w szczególności jej zwiększenie powoduje, że odległości między poszczególnymi frakcjami są mniejsze, co

zdecydowanie utrudni ich rozdzielanie. W związku z tym proporcja pomiędzy długością, a średnicą kolumny powinna być zachowana.

Przykład 5. Rozdział chromatograficzny.

Na kolumnie przygotowanej w przykładzie 4 prowadzi się chromatografię kolumnową. W tym celu wykonuje się:

- 1) rozpuszczenie osadu barwników w 3 ml mieszaniny heksan:aceton (90:10 obj./obj.) i nałożenie go na kolumnę;
- 2) elucję mieszaniną heksan:aceton (90:10 obj./obj.) do zebrania pierwszej frakcji,
- 3) elucję mieszaniną heksan:aceton (80:20 obj./obj.) i zebranie drugiej frakcji,
- 4) elucję mieszaniną heksan:aceton (80:20 obj./obj.) i zebranie trzeciej frakcji,
- 5) elucję mieszaniną heksan:aceton (70:30 obj./obj.) i zebranie czwartej frakcji, którą jest diadinoksantyna,
- 6) elucję acetonem w celu zebrania piątej frakcji i oczyszczenia kolumny w celu ponownego jej użycia.

Etapy 5 i 6 można pominąć stosując każdorazowo kolumnę chromatograficzną wypełnioną nowym złożem.

Opisany sposób pozwala na uzyskanie około 50 µg diadinoksantyny o stopniu czystości  $\geq 99\%$  z  $2 \times 10^9$  komórek okrzemek w czasie 22 godzin.

Odpowiednie przeprowadzenie rozdzielania chromatograficznego jest podstawą uzyskania oczyszczonej diadinoksantyny. Rozpuszczenie osadu barwników w 3 ml mieszaniny heksan:aceton (90:10 obj./obj.) jest optymalne by wszystkie składniki wniknęły w złożę w podobnym czasie. Testy z użyciem innych eluentów wykazały ich znaczący wpływ na proces rozdzielania. Zastosowanie wyłącznie dwóch eluentów tj. heksan:aceton (90:10 obj./obj., 60:40 obj./obj.) skutkuje uzyskaniem tylko dwóch frakcji:  $\beta$ -karotenu oraz mieszaniny diadinoksantyny i diatoksantyny. Próba rozdzielania diatoksantyny i diadinoksantyny przy użyciu innych dwóch eluentów tj. B:C (35:65 obj./obj.) oraz B:C (29:71 obj./obj.); B: 90% acetonitryl 10% woda, C: octan etylu; również nie pozwoliła na uzyskanie czystej diadinoksantyny. W związku z tym zastosowanie eluentów w podany sposób jest kluczowym elementem procedury. Proporcje pierwszego solwentu, tj. heksan:aceton (90:10 obj./obj.) pozwalają na wymywanie  $\beta$ -karotenu oraz rozpoczęcie migracji drugiej frakcji, którą stanowi niezidentyfikowany związek z grupy karotenoidów przy jednoczesnym zatrzymaniu migracji pozostałych barwników. Zmiana proporcji mieszaniny na 80:20 powoduje całkowite wymycie frakcji drugiej oraz rozpoczęcie migracji frakcji trzeciej, którą jest diatoksantyna. Mimo jej obecności w śladowych ilościach, prążek jest zauważalny i można zaobserwować

jego elucję. Równocześnie następuje powolna migracja frakcji czwartej, którą jest diadinoksantyna. Po usunięciu diatoksantyny z kolumny należy zmienić proporcje mieszaniny na 70:30 obj./obj. i prowadzić elucję właściwego barwnika, czyli diadinoksantyny. Bardzo ważne jest, by zmiany proporcji mieszaniny nie stosować przed całkowitym wypłynięciem diatoksantyny z kolumny, gdyż uniemożliwi to rozdzielanie tych barwników. Po zebraniu diadinoksantyny można prowadzić dalszą elucję acetonem, co powoduje usunięcie pozostałych barwników, w tym fukoksantyny, a tym samym umożliwia ponowne użycie złoża. Ta możliwość znacząco podnosi ekonomikę procesu.

Przykład 6. Przechowywanie diadinoksantyny.

Uzyskaną w przykładzie 5 frakcję zawierającą oczyszczoną diadinoksantynę [Ryc. 5.] należy odparować w atmosferze azotu i przechowywać w szczelnym opakowaniu w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  chroniąc przed światłem. Podwyższona temperatura, dostępność tlenu oraz światła powodują rozkład barwnika, co wynika z jego właściwości fizykochemicznych, analogicznie jak to ma miejsce w przypadku innych związków karotenoidowych. Kilkukrotne rozmrażanie produktu nie powodowało żadnych zmian. Jak dotąd pierwszy uzyskany preparat ma 10 miesięcy i nie stwierdzono jego rozkładu.