

Sposób izolacji magnofloryny z suchego wyciągu z korzeni berberysu kretańskiego

Przedmiotem wynalazku jest sposób izolacji magnofloryny z suchego ekstraktu roślinnego berberysu kretańskiego (*Berberis cretica* L.).

Chromatografia przeciwprądowa to nowoczesna technika rozdzielcza, umożliwiająca wyodrębnianie poszczególnych składowych z mieszanin związków organicznych, np. z wyciągów roślinnych przy zastosowaniu układu dwóch niemieszających się cieczy (chromatografia podziałowa ciecz-ciecz), z których jedna zatrzymana jest na rotującej kolumnie (faza stacjonarna), a druga ją obmywa (faza ruchoma). W wyniku różnic w powinowactwie poszczególnych związków do fazy stacjonarnej lub ruchomej, możliwe jest rozfrakcjonowanie złożonej matrycy. Proces rozdzielania w chromatografii przeciwprądowej odbywa się w temperaturze pokojowej, co umożliwia pracę ze związkami lotnymi, jak również przy niewielkim zużyciu rozpuszczalników o podstawowej czystości. Jest to technika uniwersalna, umożliwiająca pracę zarówno ze związkami niepolarnymi, jak i polarnymi, a powodzenie rozdzielania chromatograficznego zależy od właściwego doboru układu rozpuszczalników. Ponadto, przeniesienie warunków analitycznych do skali przemysłowej lub preparatywnej jest nieskomplikowane, a prowadzone analizy cechuje duża powtarzalność wyników i wysoka wydajność rozdzielania (proces adsorpcji wyeliminowano brakiem stałego podłoża).

Zgodnie ze znanym stanem techniki obecność magnofloryny była dotychczas stwierdzona w różnych gatunkach roślin z rodziny berberysowatych, makowatych, jaskrowatych, magnoliowatych, czy szakłakowatych. Dotychczas izolacja magnofloryny przebiegała z zastosowaniem tradycyjnej chromatografii kolumnowej na stałych adsorbentach. Magnofloryna z grupy alkaloidów izochinolinowych może mieć zastosowanie w medycynie do wytwarzania preparatów farmaceutycznych.

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie zastosowania przeciwprądowej chromatografii cieczowej do procesu oczyszczania magnofloryny z suchego ekstraktu roślinnego berberysu kretańskiego, które umożliwi ograniczenie procesu adsorpcji tego związku na stałym nośniku, co z kolei zwiększy wydajność procesu izolacji. Niniejsza nowoczesna technika separacyjna umożliwi wydajniejszą izolację alkaloidu na skalę przemysłową. Znana jest także z publikacji autorstwa: Wirginia Kukuła-Koch i inni, Application of pH-zone refining hydrostatic countercurrent chromatography (hCCC) for the recovery of antioxidant phenolics and the isolation of alkaloids from Siberian barberry herb, Food

Chemistry 203 (2016) 394–401), izolacja berberyny i magnofloryny z ziela berberysu syberyjskiego, przy użyciu dwufazowej mieszaniny, zawierającej eter metylowo-*tert*-butylowy oraz wodę, w trybie zależnym od pH. Metoda ta nie przyniosła jednak oczekiwanych efektów w procesie izolacji magnofloryny z berberysu kretańskiego, który charakteryzuje się znacznie większą zawartością tego alkaloidu w wyciągach z korzenia.

Sposób izolacji magnofloryny z suchego ekstraktu z korzenia berberysu kretańskiego (*Berberis cretica* L.) według wynalazku, za pomocą przeciwprądowej chromatografii cieczowej polega na tym, że sporządza się dwufazową mieszaninę rozpuszczalników octan etylu: butanol: woda w ilościach procentowych względem całej mieszaniny 8-15% (V/V) octanu etylu, 24-34% (V/V) butanolu, 50-68% (V/V) wody, a następnie prowadzi się rozdzielanie za pomocą przeciwprądowej chromatografii w trybie elucji (faza ruchoma), stosując rotację kolumny w zakresie 1000-1800 obrotów/m, po czym otrzymaną z jednej z frakcji wyizolowaną magnoflorynę oczyszcza się na kolumnie wypełnionej adsorbentem, korzystnie sita molekularnego, z substancji balastowych, poprzez przemywanie mieszaniną wody z metanolem (korzystnie 50: 50 V/V).

Opracowana technika oczyszczania magnofloryny z wyciągu suchego z korzeni berberysu kretańskiego przy pomocy przeciwprądowej chromatografii cieczowej umożliwi izolację alkaloidu w skali preparatywnej, w szybki i wydajny sposób, w czystości ponad 90%. Dzięki zastosowaniu chromatografii przeciwprądowej i wyeliminowaniu stałego adsorbentu autorom osiągnięcia udało się zniwelować proces ogonowania innych alkaloidów występujących w wyciągu, zanieczyszczających magnoflorynę.

Wprowadzenie przeciwprądowej chromatografii cieczowej do procesu oczyszczania magnofloryny umożliwi ograniczenie procesu adsorpcji tego związku na stałym nośniku, który w znaczący sposób ogranicza wydajność procesu izolacji. Chromatografia przeciwprądowa wykorzystuje dwie niemieszające się ciecze, pomiędzy którymi dochodzi do rozdzielania związków z bogatej matrycy, jakim jest wyciąg roślinny, z bardzo dużą wydajnością. Zastosowany układ rozpuszczalników pozwolił na wyodrębnienie magnofloryny w efektywnej ilości od pozostałych składników próbek.

Przykład 1

Izolację magnofloryny z wyciągu suchego z kasztanowca przeprowadzono na chromatografie przeciwprądowym CPC (Armen SCPC-250-L), wyposażonym w kolumnę o pojemności 250 mL, detektor UV i kolektor frakcji. Do izolacji alkaloidu wybrano układ:

octan etylu: butanol: woda (0,6: 1,5: 3 V/V/V). Rozdzielanie prowadzono w trybie zstępującym, przy 1300 obrotach na minutę. Zbierane frakcje miały objętość 32 mL. Przepływ rozpuszczalnika wynosił 6 ml/min do końca trwania procesu, tj do 150 min. Po upływie 90 min analizę prowadzono w trybie ekstruzji z wykorzystaniem fazy stacjonarnej jako fazy ruchomej, wciąż w trybie zstępującym, do 150 minuty. Magnoflorynę otrzymano już w 35 minucie i zbierano ją przez okres 8 minut.

Otrzymaną oczyszczoną i zatężoną frakcję zawierającą magnoflorynę naniesiono na kolumnę wypełnioną do połowy żelem Sephadex LH-20 (sitem molekularnym), średnicy 2 cm, a następnie przemywano wodą destylowaną z metanolem (50:50 V/V). Frakcje zbierano do probówek poj. 5 mL. Czysty alkaloid znajdował się we frakcjach 9-18.

Zaproponowana technika oczyszczania magnofloryny stanowi alternatywę dla istniejących obecnie metod, gwarantuje pozyskiwanie tego alkaloidu z korzeni berberysu kretańskiego, dla którego określono najwyższą zbadaną zawartość. Opracowane warunki oczyszczania mogą być wykorzystane w skali przemysłowej.

Anna Betz