Sposób otrzymywania damasceniny z nasion czarnuszki damasceńskiej (*Nigella damascena* L.)

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania damasceniny z nasion czarnuszki damasceńskiej (*Nigella damascena* L.).

Czarnuszka damasceńska rodzina Jaskrowate (*Nigella damascena* L., Ranunculaceae) jest jednoroczną rośliną występującą naturalnie w południowo-wschodniej i południowej części Europy, Afryce Północnej, w Azji Zachodniej i na Kaukazie. W Polsce jest rośliną uprawianą do celów dekoracyjnych. Czarnuszka damasceńska stosowana jest w medycynie Orientu w różnego rodzaju nieżytach lub jako środek moczopędny. Nasiona bogate są w alkaloid damasceninę, którego najwięcej jest w dojrzałych nasionach (0.1-0.3% w przeliczeniu na suchą masę). Wykazano działanie przeciwbólowe, znieczulające i przeciwgorączkowe damasceniny (Yacine BOUGUEZZA, Bachra KHETTAL, Lydia TIR, Souad BOUDRIOUA. Damascenine induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in mice and in vitro assessed human erythrocyte toxicity. InterdiscipToxicol. 2015; Vol. 8(3): 118–124).

Dotychczas damascenina izolowana była w oparciu o metodę opisaną przez Erwin i wsp z 1912 roku (https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=25336; Ewins AJ. (1912). LXII. –The constitution and synthesis of damascenine, the alkaloid of Nigella damascena. J ChemSoc, Trans 101: 544–552.) Rozdrobnione owoce czarnuszki damasceńskiej poddawano 8-godzinnej ekstrakcji niepolarnym eterem naftowym, ekstrakt zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem i poddano działaniu 5% roztworowi kwasu solnego. Otrzymany roztwór wytrząsano wielokrotnie eterem naftowym, warstwę wodną zalkalizowano amoniakiem i w efekcie alkaloid wyekstrahowany został do eteru naftowego. Eter odparowano otrzymując alkaloid damasceninę, której czystość oszacowano na poziomie 95% z zastosowaniem techniki HPLC. Wydajność procesu wynosiła 0.15%.

W roku 2004 opisano (Fico G, Panizzi L, Flamini G, Braca A, Morelli I, Tomè F, Cioni PL. (2004). Biological screening of Nigella damascena for antimicrobial and molluscicidal activities. Phytother Res 18(6): 468–470) sposób otrzymania damasceniny z wody pozostałej po destylacji olejku eterycznego z czarnuszki damasceńskiej. Nasiona poddawano destylacji z parą wodną. Pozostałą wodę wytrząsano wielokrotnie porcjami butanolu. Po odparowaniu obu ekstraktów do sucha otrzymano ekstrakt butanolowy, który poddany został następnie rozdzieleniu chromatograficznemu z użyciem Sephadex LH-20 jako złoża i metanolu jako eluentu. Nie podano czystości związku a jego identyfikacja przeprowadzona została jedynie z zastosowaniem techniki TLC i HPLC.

Metody te były uciążliwe, wymagały długiego procesu oczyszczania ekstraktu. Ponadto wydajność otrzymywanej substancji była na niskim poziomie, więc metody nie nadawały się do preparatyki większej ilości związku.

Wynalazek rozwiązuje zagadnienie izolacji damasceniny przy zastosowaniu techniki wysokosprawnej chromatografii przeciwprądowej (high performance counter-current chromatography- HPCCC). Zastosowanie układu ciecz-ciecz i brak fazy stałej jako fazy stacjonarnej zapewnia bezstratne pozyskanie czystego związku w krótkim czasie.

Okazało się, że zastosowanie techniki chromatografii przeciwprądowej do izolacji damasceniny z olejku eterycznego z czarnuszki damasceńskiej daje wysoką wydajność procesu oraz pozwala uzyskać damasceninę o wysokiej czystości.

Sposób izolacji damasceniny według wynalazku polega na tym, że w pierwszym etapie rozdrobnione dojrzałe owoce poddaje się destylacji z parą wodną celem otrzymania olejku eterycznego. Po 3-godzinnej ekstrakcji w aparacie Derynga/Clevengera otrzymuje się olejek eteryczny, który poddaje się rozdzielaniu przy użyciu wysokosprawnej chromatografii przeciwprądowej z dwufazową mieszaniną rozpuszczalników o składzie eter naftowy, acetonitryl, aceton, które występują odpowiednio w stosunku od 1.5:0.75:0.25 do 2.5:1.75:0.75 (v/v/v) korzystnie 2 : 1.5 : 0.5 (v/v/v), przy czym olejek eteryczny w ilości od 0,5% do 5%, korzystnie od 1,6% do 3,2% przed rozdzielaniem rozpuszcza się w próbce mieszaniny rozpuszczalników o takim samym składzie jak dwufazowa mieszanina rozpuszczalników, albo tylko w fazie górnej lub dolnej stosowanego układu rozpuszczalników, korzystnie w mieszaninie o równym stosunku obu faz, a rozdzielanie prowadzi się w układzie faz odwróconych, w temperaturze 25-35 °C korzystnie 26 °C. Następnie po rozdzieleniu zbiera się frakcje, stanowiące damasceninę.

Korzystnie, gdy rotację kolumny prowadzi się przy maksymalnej ilości obrotów kolumny, korzystnie 1600 rpm.

Korzystnie, gdy po rozdzieleniu frakcje odpowiadające eluowanemu związkowi - damasceninie zbiera się przy prędkości przepływu 6 ml/min od pojawienia się na chromatogramie pierwszego piku.

Rozdzielenie monitoruje się przy długości fali 210 nm. Damasceninę izoluje się w czasie do 11 minut.

Proponowana metoda pozwala uzyskać damasceninę o wysokiej czystości do 99.47% i wydajności procesu na poziomie 22%. Ponadto metoda według wynalazku pozwala zredukować czas izolacji. Nadaje się do zastosowania w warunkach na skalę przemysłową. Efekty te są możliwe dzięki zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii przeciwprądowej z układem rozpuszczalników: eter naftowy, acetonitryl, aceton i olejku eterycznego jako źródła związku.

Damascenina ze względu na swoje właściwości lecznicze może być wykorzystana jako lek lub składnik leku o potencjalnym działaniu przeciwbólowym, znieczulającym i przeciwzapalnym.

Przykład

W rozdzielaczu przygotowano dwufazowy układ rozpuszczalników będący mieszaniną eteru naftowego, acetonitrylu, acetonu w stosunku 2 : 1.5 : 0.5 (v/v). Po wytrząśnięciu i rozdzieleniu faz, fazę górną i dolną zebrano do dwóch oddzielnych, opisanych butelek. Butelki umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na 10 minut w celu pozbycia się pęcherzyków powietrza. Po wypełnieniu kolumny fazą stacjonarną, faza górna układu dwufazowego), włączono obroty kolumny, które stopniowo zwiększano do 1600 rpm. Następnie wypełniano kolumnę fazą ruchomą (faza dolna układu dwufazowego) z prędkością przepływu 6 ml/min. Po osiągnięciu przez układ stanu równowagi, czyli momentu w którym nie wypływa faza stacjonarna, do kolumny zadozowano 155 mg olejku eterycznego rozpuszczonego w mieszaninie złożonej z 3 ml fazy górnej i 3 ml fazy dolnej. Zbierano jednominutowe frakcje przy prędkości przepływu 6 ml/min od pojawienia się na chromatogramie pierwszego piku. Detekcję związków prowadzono przez pomiar absorbancji przy długości fali λ = 210 nm. Izolację prowadzono w temperaturze 26^{0}C. Frakcje identyfikowano z zastosowaniem chromatografii gazowej (GC-MS).

Wydajność procesu wynosiła 22%. Po zadozowaniu do kolumny 155 mg olejku eterycznego otrzymano 8 mg damasceniny o czystości 99.47% w czasie 11 minut.

Rozdzielenie monitoruje się przy długości fali 210 nm. Damasceninę izoluje się w czasie do 11 minut. Możliwe jest dzięki temu otrzymanie damasceniny o czystości do 99.47%.

Proponowana metoda jest procesem szybkim, tanim, przyjaznym ekologicznie, pozwala zredukować koszty i czas izolacji, jest odpowiednia do przeniesienia warunków na skalę przemysłową. Damascenina wykorzystana może być w lecznictwie jako lek o potencjalnym działaniu przeciwbólowym, znieczulającym i przeciwzapalnym

Rzecznik patentowy
Anna Bełz