

Sposób oznaczania zawartości (2*E*, 6*Z*, 8*E*)-*N*-izobutylo-2,6,8-dekatrienoamidu (spilantolu) w mieszaninach wieloskładnikowych

Przedmiotem wynalazku jest sposób oznaczania zawartości (2*E*, 6*Z*, 8*E*)-*N*-izobutylo-2,6,8-dekatrienoamidu w mieszaninach wieloskładnikowych.

(2*E*, 6*Z*, 8*E*)-*N*-izobutylo-2,6,8-dekatrienoamid, nazywany zwyczajowo spilantolem lub afininą, jest substancją o wielokierunkowej aktywności biologicznej, wykazującą działanie antybakteryjne, antywirusowe, przeciwzapalne, przeciwbólowe, przeciwgrzybicze i antyhistaminowe. Szczególne zainteresowanie praktyczne ekstraktami spilantolu związane jest ze zdolnością tego związku do rozluźniania napięcia mięśni gładkich w tym mięśni mimicznych twarzy, co powoduje, iż ekstrakty zawierające spilantol są wykorzystywane w kosmetologii do produkcji preparatów przeciwzmarszczkowych, substytutów botoksu przez takie firmy kosmetyczne jak między innymi Gatuline[®], SYN[®]- COLL, Clarins, Bioliq i inne. Oprócz blokowania aktywności skurczowej mięśni twarzy, spilantol wykazuje również działanie pielęgnujące (przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, przeciwutleniające). Ekstrakt zawierający spilantol poprawia wchłanianie innych aktywnych składników preparatu kosmetycznego, co przyczynia się do zwiększenia skuteczności osiągania zamierzonych efektów kosmetyku oraz pozwala ograniczyć koszty produkcji poprzez użycie mniejszych ilości innych substancji aktywnych. Dzięki udokumentowanemu działaniu przeciwbólowemu, przeciwzapalnemu oraz miejscowo znieczulającemu, ekstrakt zawierający spilantol znajduje zastosowanie jako komponent past do zębów oraz przeciwbólowych żeli stomatologicznych m.in. firm Buccaldol[®], SwissDent, Idolphar[®]. [Barbosa 2016, Fang-Rong Chang 2015, Spiegeleer 2013].

Najbardziej rozpowszechnioną metodą pozyskiwania spilantolu jest jego ekstrakcja z surowców roślinnych za pomocą rozpuszczalników organicznych, takich jak etanol, metanol, octan etylu, chloroform, heksan, eter naftowy [Fang-Rong Chang 2015, Freitas-Blanco 2016, Moreno 2012, Rao 2012, Sharma 2011]. Poza doborem właściwych warunków ekstrakcji i oczyszczania ekstraktu, istotnym elementem jest zapewnienie kontroli analitycznej

kluczowych etapów procesu ekstrakcji oraz ekstraktów finalnych, umożliwiającej oznaczanie zawartości spilantolu na każdym etapie produkcji komponentów kosmetycznych.

Ekstrakt otrzymywany na bazie roślin astrowatych (Asteraceae), wśród których wyróżnia się m. in. *Spilanthes alba*, *Spilanthes calva*, *Spilanthes americana*, *Spilanthes ocyimifolia* oraz *Acmella oleracea* (syn. *Spilanthes Oleracea*, Jambu, Paracress, *Spilanthes Acmella*), oprócz spilantolu zawiera kilka innych *N*-alkiloamidów (Fig.1) oraz m.in. kwas *trans*-ferulowy, kwas *trans*-izoferulowy, kwas 3-acetylolauretowy, kwas wanilinowy, β -sitostenon oraz skopoletynę. Najszersze spektrum cennych właściwości, a przy tym najwyższą aktywność biologiczną wykazuje spilantol, należący do grupy *N*-alkiloamidów. [Fang-Rong Chang 2015, Prachayasittikul 2009]

Oznaczanie zawartości spilantolu w ekstraktach będących mieszaninami wieloskładnikowymi jest trudnym zagadnieniem analitycznym ze względu na złożony skład chemiczny badanych próbek. Najczęściej stosowaną i opisywaną w literaturze naukowej metodą oznaczania zawartości spilantolu w surowcu roślinnym oraz jego ekstraktach jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) [Fang-Rong Chang 2015, Boonen 2010]. Jest to jednak metoda pracochłonna, wymagająca przeprowadzania kalibracji z użyciem trudno dostępnych i drogich próbek spilantolu o wysokiej czystości. Zasadniczym ograniczeniem metody HPLC jest to, że w ekstraktach oprócz spilantolu występuje co najmniej 15 substancji o bardzo podobnej strukturze i charakterze chemicznym oraz zbliżonej masie cząsteczkowej. [Boonen 2010, Dubey 2013, Fang-Rong Chang 2015] Ze względu na niedostępność odpowiednich wzorców, a więc brak możliwości ustalenia czasów retencji składników badanej mieszaniny, metoda HPLC nie daje gwarancji czy pik chromatograficzny wytypowany jako pik czystego spilantolu odpowiada w rzeczywistości czystej substancji czy mieszaninie spilantolu z innymi substancjami o zbliżonym charakterze chemicznym. Jednakże nawet w przypadku dysponowania wzorcem spilantolu, identyfikacja substancji metodą HPLC oparta jest na pojedynczej liczbowej właściwości fizykochemicznej, jaką jest czas retencji w określonych warunkach analizy, co czyni tę identyfikację niepewną. Wynik analizy metodą HPLC może być ponadto zafałszowany, ze względu na podobne wartości czasów retencji innych składników mieszaniny, szczególnie izomerów i homologów spilantolu (Fig.1). Szczególnie trudnym problemem jest oznaczenie zawartości spilantolu metodą HPLC w mieszaninach, których nośnikiem jest substancja nielotna, np. trigliceryd kapronowo-kaprylowy, który jest szczególnie wygodnym nośnikiem spilantolu do celów kosmetycznych. Podczas analizy

metodą HPLC substancja ta stanowi uciążliwy balast, utrudniający rozdzielanie i analizę próbki, niemożliwy do usunięcia przez odparowanie.

Przedmiotem wynalazku jest nowy, prosty i wiarygodny sposób oznaczania zawartości (2*E*, 6*Z*, 8*E*)-*N*-izobutylo-2,6,8-dekatrienoamidu w mieszaninach wieloskładnikowych, bez konieczności uciążliwego przygotowywania próbki, a zwłaszcza separowania spilantolu metodami chromatograficznymi.

Sposób oznaczania zawartości (2*E*, 6*Z*, 8*E*)-*N*-izobutylo-2,6,8-dekatrienoamidu w mieszaninach wieloskładnikowych polega na tym, że do próbki mieszaniny wieloskładnikowej w ilości co najmniej 0,1 cm³ dodaje się wzorzec wewnętrzny w ilości co najmniej 0,05 mg, rozpuszczalnik odparowuje się znanymi metodami, po czym spilantol i wzorzec ekstrahuje się rozpuszczalnikiem deuterowanym w ilości co najmniej 0,5 cm³, a następnie wykonuje pomiar metodą magnetycznego rezonansu jądrowego ¹H-NMR, po czym oblicza zawartość spilantolu w próbce na podstawie stosunku wartości całek sygnałów analitycznych spilantolu oraz sygnałów wzorca wewnętrznego.

Sposób oznaczania zawartości (2*E*, 6*Z*, 8*E*)-*N*-izobutylo-2,6,8-dekatrienoamidu w mieszaninach wieloskładnikowych, których nośnikiem jest trigliceryd kapronowo-kaprylowy polega na tym, że do próbki mieszaniny wieloskładnikowej w ilości co najmniej 10 mg, dodaje się chloform deuterowany w ilości co najmniej 0,5 cm³, rejestruje widmo ¹H-NMR, po czym oznacza zawartość spilantolu w ekstrakcie na podstawie stosunku wartości całek wybranych sygnałów analitycznych spilantolu do wybranych sygnałów analitycznych triglicerydu kapronowo-kaprylowego.

Korzystnie sposób oznaczania zawartości (2*E*, 6*Z*, 8*E*)-*N*-izobutylo-2,6,8-dekatrienoamidu według wynalazku polega na tym, że mieszaninę wieloskładnikową stanowią ekstrakty spilantolu na bazie surowców roślinnych i etanolu lub chlorku metylenu lub heksanu o stężeniu od 95 do 99%.

Korzystnie sposób oznaczania zawartości (2*E*, 6*Z*, 8*E*)-*N*-izobutylo-2,6,8-dekatrienoamidu według wynalazku polega na tym, że jako wzorzec wewnętrzny stosuje się dimetylodifenylosilan.

Korzystnie sposób oznaczania zawartości (2*E*, 6*Z*, 8*E*)-*N*-izobutylo-2,6,8-dekatrienoamidu według wynalazku polega na tym, że jako rozpuszczalnik deuterowany stosuje się CDCl₃-d₁, MeCN-d₃.

Korzystnie sposób oznaczania zawartości (2*E*, 6*Z*, 8*E*)-*N*-izobutylo-2,6,8-dekatrienoamidu w mieszaninach wieloskładnikowych, oraz w mieszaninach wieloskładnikowych, których nośnikiem jest trigliceryd kapronowo-kaprylowy według wynalazku polega na tym, że jako sygnały analityczne spilantolu stosuje się sygnały protonów H₂, H₃, H₇, H₈.

Korzystnie sposób oznaczania zawartości (2*E*, 6*Z*, 8*E*)-*N*-izobutylo-2,6,8-dekatrienoamidu w mieszaninach wieloskładnikowych, których nośnikiem jest trigliceryd kapronowo-kaprylowy polega na tym, że jako sygnały analityczne triglicerydu kapronowo-kaprylowego stosuje się sygnał grupy OCH₂.

Istota opracowanej metody według wynalazku polega na zastosowaniu wzorca wewnętrznego w postaci difenyloдимetylosilanu (Ph₂Me₂Si) lub triglicerydu kapronowo-kaprylowego (TGKK), następnie całkowitym wyekstrahowaniu spilantolu i wzorca wewnętrznego z badanego układu rozpuszczalnikiem deuterowanym (CDCl₃-d₁, MeCN-d₃), rejestrowaniu widm magnetycznego rezonansu jądrowego (1H-NMR, 400 MHz lub 600 MHz), mierzeniu wartości całek sygnałów analitycznych spilantolu (protony H₂, H₃, H₇, H₈) oraz wartości całki sygnału wzorca wewnętrznego (dla Ph₂Me₂Si protony CH₃; dla TGKK protony OCH₂), a następnie obliczeniu zawartości spilantolu w badanej próbce według wzoru 1 lub 2.

W celu wytypowania sygnałów analitycznych oraz uzyskania pełnej charakterystyki spektroskopowej spilantolu twórcy wynalazku metodą chromatografii kolumnowej otrzymali próbkę spilantolu o czystości 83%, a następnie wykonali pomiary metodą protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego (Fig. 2, 1H-NMR, CDCl₃, 600MHz).

Autorzy wykazali, że zastosowane warunki pomiaru pozwalają na otrzymywanie widm magnetycznego rezonansu jądrowego (1H-NMR), w których część charakterystycznych sygnałów spilantolu jest dobrze wyizolowana, a wybrane sygnały analityczne nie są zakłócone przez sygnały innych składników badanej mieszaniny, ani też przez sygnały wzorców wewnętrznych. Jako sygnały analityczne wytypowano sygnały protonów o charakterystycznej strukturze dubletu (d) lub dubletu dubletów (dd) lub dubletu trypletów (dt), posiadające charakterystyczne stałe sprzężenia: 6.82 (dt, 1H, $J_1 = 6.7 \text{ Hz}$, $J_2 = 15.2 \text{ Hz}$ H-3), 6.29 (dd, 1H, $J_1 = 11.0 \text{ Hz}$, $J_2 = 15.0 \text{ Hz}$, H-8), 5.97 (dd-t, 1H, $J_1 = J_2 = 10.9 \text{ Hz}$, H-7) 5.80 (d, 1H, $J_1 = 15.3 \text{ Hz}$, H-2).

Jak wykazały badania twórców wynalazku, istotne jest również odpowiednie przygotowanie badanej próbki, polegające na dodaniu do wieloskładnikowej mieszaniny (np. ekstraktu etanolowego, ekstraktu w chlorku metylenu) dokładnie określonej ilości wzorca

wewnętrznego, odparowaniu rozpuszczalnika, wysuszeniu pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie wykonaniu wyczerpującej ekstrakcji spilantolu i wzorca z pozostałości deuterowanym rozpuszczalnikiem (przykład 1 i 2). Sposób według wynalazku zapewnia całkowite rozpuszczenie spilantolu oraz otrzymanie próbek homogenicznych i wolnych od osadów. W przypadku ekstraktów spilantolu w triglicerydzie kapronowo-kaprylowym (TGKK) nie ma konieczności odparowywania rozpuszczalnika i stosowania dodatkowej substancji w roli wzorca wewnętrznego, ponieważ sam TGKK jest równocześnie nośnikiem mieszaniny i wzorcem wewnętrznym (przykład 3).

Dodatkową korzyścią wynikającą z zastosowania rozwiązania według wynalazku jest wyeliminowanie konieczności dysponowania wzorcami spilantolu oraz substancji o podobnym charakterze, które towarzyszą spilantolowi. W przeciwieństwie do metody HPLC, identyfikacja spilantolu jako określonego indywiduum chemicznego nie budzi tu żadnych wątpliwości, ponieważ jest dokonywana na podstawie czterech charakterystycznych grup sygnałów protonów, z których każdy charakteryzuje się określonym przesunięciem chemicznym, integracją, multipletowością i charakterystycznym zestawem stałych sprzężenia (Fig. 2). Dzięki rozwiązaniu według wynalazku możliwe jest oznaczenie zawartości spilantolu w mieszaninach wieloskładnikowych, nawet w obecności substancji o nieznannej strukturze.

Sposób według wynalazku przedstawiono w poniższych przykładach wykonania.

Przykład 1

Oznaczanie zawartości spilantolu w ekstrakcie etanolowym

Do ekstraktora wprowadza się rozdrobniony materiał roślinny *Acemella oleracea* w ilości 0,5 kg i 1,43 kg etanolu o stężeniu 95,6%. Po 24 godzinach ekstrakcji uzyskuje się 1,03 kg ekstraktu etanolowego.

W kolbie okrągłodennej o pojemności 10 cm³ umieszcza się 2 cm³ ekstraktu etanolowego i precyzyjnie waży w celu oznaczenia masy próbki (m_p). Następnie dodaje się 1 cm³ roztworu wzorca wewnętrznego w etanolu (30 mg Ph₂Me₂Si / 100 cm³ EtOH) i ponownie precyzyjnie waży w celu obliczenia masy dodanego wzorca (m_wz). Następnie rozpuszczalnik odparowuje się na wyparce rotacyjnej, a pozostałość suszy przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość (30 mg) poddaje się ekstrakcji deuterowanym chloroformem (0,70 cm³), a następnie wykonuje się pomiar metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H NMR). Zawartość spilantolu w ekstrakcie etanolowym wylicza się ze wzoru 1 na podstawie całki sygnałów spilantolu przy 6.8, 6.3, 6.0 i 5.8 ppm oraz całki sygnału grup metylowych difenyloдимetylosilanu przy 0,6 ppm.

$$m_{SPL} = \frac{C_{SPL} M_{SPL} n_{wz} m_{wz}}{C_{wz} M_{wz} n_{SPL}} \quad [mg]$$

Wzór 1

gdzie:

- C_{SPL} suma wartości całek sygnałów H_2, H_3, H_7, H_8 spilantolu
- C_{wz} wartość całki sygnału wzorca wewnętrznego (Ph_2Me_2Si)
- M_{SPL} masa cząsteczkowa spilantolu (221,3 g/mol),
- M_{wz} masa cząsteczkowa wzorca wewnętrznego (212,4 g/mol),
- m_{SPL} zawartość spilantolu w próbce poddanej analizie NMR (mg)
- m_{wz} masa wzorca wewnętrznego (mg),
- n_{SPL} liczba protonów spilantolu ($n = 4$)
- n_{wz} liczba protonów wzorca wewnętrznego (dla Ph_2Me_2Si $n = 6$)

Znajomość masy spilantolu w badanej próbce ekstraktu (m_{SPL}) oraz masy próbki (m_P) pozwala obliczyć zawartość procentową spilantolu w próbce.

Przykład 2

Oznaczanie zawartości spilantolu w chlorku metylenu

Suchy ekstrakt spilantolowy o masie 14,2 g, uzyskany przez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem 750 g ekstraktu etanolowego, ekstrahuje się dwukrotnie 35 cm³ chlorku metylenu.

W kolbie okrągłodennej o pojemności 10 cm³ umieszcza się 0,5 cm³ ekstraktu spilantolu w chlorku metylenu i precyzyjnie waży w celu oznaczenia masy próbki (m_P). Następnie dodaje się 1 cm³ roztworu wzorca wewnętrznego w etanolu (30 mg Ph_2Me_2Si /100 cm³ EtOH) i ponownie precyzyjnie waży w celu obliczenia masy dodanego wzorca (m_{wz}). Następnie rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej, a pozostałość suszy przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość (62 mg) poddaje się ekstrakcji deuterowanym chloroformem (0,70 cm³), a następnie wykonuje się pomiar metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H NMR). Zawartość spilantolu w chlorku metylenu wylicza się ze wzoru 1 na podstawie całki sygnałów spilantolu przy 6,8, 6,3, 6,0 i 5,8 ppm oraz całki sygnału grup metylowych difenyldimetylosilanu przy 0,6 ppm.

Przykład 3

Oznaczanie zawartości spilantolu w heksanie

Suchy ekstrakt spilantolowy o masie 10 g, uzyskany przez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem 530 g ekstraktu etanolowego, ekstrahuje się dwukrotnie 25 cm³ heksanu.

W kolbie okrągłodennej o pojemności 10 cm³ umieszcza się 1 cm³ ekstraktu spilantolu w heksanie i precyzyjnie waży w celu oznaczenia masy próbki (m_P). Następnie dodaje się 1 cm³ roztworu wzorca wewnętrznego w etanolu (30 mg Ph₂Me₂Si /100 cm³ EtOH) i ponownie precyzyjnie waży w celu obliczenia masy dodanego wzorca (m_{WZ}). Następnie rozpuszczalniki odparowuje się na wyparce rotacyjnej, a pozostałość suszy przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość (35 mg) poddaje się ekstrakcji deuterowanym chloroformem (0,70 cm³), a następnie wykonuje się pomiar metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H NMR). Zawartość spilantolu w heksanie wylicza się ze wzoru 1 na podstawie całki sygnałów spilantolu przy 6.8, 6.3, 6.0 i 5.8 ppm oraz całki sygnału grup metylowych difenyloдимetylosilanu przy 0,6 ppm.

Przykład 4

Oznaczanie zawartości spilantolu w triglicerydzie kapronowo-kaprylowym

Suchy ekstrakt spilantolowy o masie 13,3 g, uzyskany przez odparowanie pod zmniejszonym ciśnieniem 142 g ekstraktu spilantolu w chlorku metylenu, ekstrahuje się 14 g triglicerydu kapronowo-kaprylowego, określając precyzyjnie masę triglicerydu (m_{TG}) oraz masę ekstraktu (m_E). Do 80 mg ekstraktu spilantolu w triglicerydzie kapronowo-kaprylowym, dodaje się 0,7 cm³ CDCl₃ i rejestruje widmo ¹H-NMR. Zawartość spilantolu w triglicerydzie kapronowo-kaprylowym wylicza się ze wzoru 2, mierząc całki sygnałów spilantolu przy 6.8, 6.3, 6.0 i 5,8 ppm oraz całkę sygnału grupy OCH₂ triglicerydu w zakresie 4.32 – 4.29 ppm.

$$m_{SPL} = \frac{C_{SPL} M_{SPL} n_{TG} m_{TG}}{C_{TG} M_{TG} n_{SPL}} [mg]$$

Wzór 2

gdzie:

C_{SPL} suma wartości całek sygnałów H₂, H₃, H₇, H₈ spilantolu

C_{TG} wartość całki sygnału wzorca wewnętrznego (TGKK)

M_{SPL} masa cząsteczkowa spilantolu (221,3 g/mol),

- M_{TG} masa cząsteczkowa triglicerydu kapronowo-kaprylowego
 m_{SPL} zawartość spilantolu w ekstrakcie w TGKK
 m_{TG} masa triglicerydu (TGKK, mg),
 n_{SPL} liczba protonów spilantolu ($n = 4$)
 n_{TG} liczba protonów wzorca wewnętrznego (dla TGKK $n = 2$)

Znajomość masy spilantolu w ekstrakcie (m_{SPL}) oraz masy ekstraktu (m_E) pozwala obliczyć zawartość procentową spilantolu w próbce.

Katedra Chemii
Magdalena Kowalska

Literatura

Barbosa A. F. i in. 2016. Spilanthol: Occurrence, extraction, chemistry and biological activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 26(1): 128-133.

Fang-Rong Chang i in. 2015. Alkylamides of *Acmella oleracea*. *Molecules* 20(4): 6970-6977.

Boonen 2012 LC-MS N-alkylamide Profiling of an Ethanolic *Anacyclus pyrethrum* Root Extract. *Planta Med* 2012; 78: 1787–1795

De Spiegeleer B. i in. 2013. Skin penetration enhancing properties of the plant *N*-alkylamide spilanthol. *Journal of Ethnopharmacology* 148(1): 117-125.

Dubey S. i in. 2013. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes Acmella*: A review. *Advances in Pharmacological Sciences*, (ID423750, doi.org/10.1155/2013/423750)

Freitas-Blanco V. S. et al., 2016: „Development and evaluation of a novel mucoadhesive film containing *Acmella Oleracea* extract for oral mucosa topical anesthesia”, *PLOS ONE*, 11(9), 1–19.

Moreno S. C. et al., 2012: „Bioactivity of compounds from *Acmella oleracea* against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) and selectivity to two non-target species”, *Pest Management Science*, 68(3), 386–393.

Prachayasittikul S. i in. 2009. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. *Molecules* 14(2): 850-867.

Rao B. G., Rao Y. V., Rao T. M., 2012: „Hepatoprotective activity of *Spilanthes acmella* Extracts against CCl₄- induced liver toxicity in rats”, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, 208–211.

Sharma V. et al., 2011: „*Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats”, *Phytomedicine*, 18(13), 1161–1169

K. ...
M. ...
