

Sposób otrzymywania ekstraktu zawierającego betulinę z kory brzozy brodawkowatej

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania ekstraktu zawierającego betulinę (triterpen pentacykliczny) z kory brzozy brodawkowatej, który wykorzystywany jest do otrzymywania preparatów kosmetycznych.

Dotychczasowe metody izolacji związków chemicznych z materiału roślinnego opierają się zazwyczaj na zastosowaniu rozpuszczalników organicznych które cechują się bardzo często dużą toksycznością. Negatywny wpływ przemysłu chemicznego na środowisko naturalne sprawia, że coraz większą uwagę skupia się na zastosowaniu tzw. zielonej chemii. Jednym z rozwiązań w tym zakresie jest wprowadzenie jako ekstrahentów naturalnych głęboko eutektycznych rozpuszczalników (NADES – natural deep eutectic solvents). Są to mieszaniny związków chemicznych które po zmieszaniu topią się w temperaturze znacznie niższej niż poszczególne ich składniki. Takimi mieszaninami są m.in. mieszaniny mentolu i tymolu lub tymolu i kamfory (PAT - P.433136), które po zmieszaniu w odpowiednich proporcjach tworzą ciecze w temperaturze pokojowej. Istnieją bardzo ograniczone dane na temat zastosowania mieszanin eutektycznych tymolu i borneolu jako ekstrahentów. Mieszaniny takie użyto do ekstrakcji typu ciecz-ciecz warfaryny (Majidi i Hadjmohammadi 2020. Hydrophobic borneol-based natural deep eutectic solvents as a green extraction media for air-assisted liquid-liquid micro-extraction of warfarin in biological samples. J. Chom. A. 1621, 461030). mmmppppppp

W trakcie prowadzonych badań, nieoczekiwanie okazało się, że mieszaniny tymolu i borneolu są wydajnymi ekstrahentami betuliny (IUPAC: Lup-20(29)-ene-3 β ,28-diol) (Ryc. 1) z kory brzozy brodawkowatej (ekstrakcja ciało stałe-ciecz). Poniżej na Fig. 1 przedstawiono wzór betuliny.

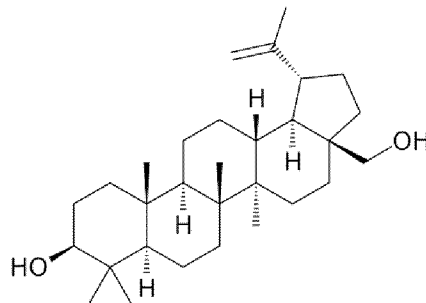


Fig. 1

Kora brzozy (z brzozy brodawkowatej – *Betula pendula* Roth) jest głównym surowcem służącym do pozyskiwania betuliny – triterpenu pentacyklicznego o dużej aktywności biologicznej, powszechnie stosowanego w preparatach kosmetycznych. Do ekstrakcji betuliny z tego surowca stosuje się najczęściej chloroform (Green, Bentley, Chung, Lynch, Jensen 2007. Isolation of betulin and rearrangement to allobetulin. J. Chem. Educ. 84, 12, 1985) a więc rozpuszczalnik o bardzo dużej toksyczności. Zastosowanie takiego ekstrahentu nie tylko negatywnie oddziałuje na środowisko naturalne ale również stwarza ryzyko pozostałości tego związku w otrzymywanych ekstraktach.

Nieoczekiwanie okazało się, że użycie mieszanin eutektycznych tymolu i borneolu zmieszanych w odpowiednim stosunku masowym stanowi skuteczny sposób pozyskiwania betuliny z brzozy wykorzystywanej w kosmetologii, przy wyeliminowaniu zanieczyszczenia

preparatów kosmetycznych pozostałościami ekstrahentów charakteryzujących się znaczną toksycznością.

Wynalazek rozwiązuje problem otrzymywania ekologicznego ekstraktu z kory brzozy polegającego na użyciu do ekstrakcji betuliny nietoksycznych rozpuszczalników mających zastosowanie w przemyśle kosmetycznym. Użycie nietoksycznych rozpuszczalników umożliwi eliminację zanieczyszczenia preparatów kosmetycznych pozostałościami ekstrahentów charakteryzujących się znaczną toksycznością. Sposób ekstrakcji według wynalazku jest więc przyjazną środowisku naturalnemu - ekologiczną alternatywą izolacji betuliny z kory brzozy.

Istotą sposobu otrzymywania ekstraktu zawierającego betulinę (triterpen pentacykliczny) z kory brzozy według wynalazku jest to, że w procesie ekstrakcji stosuje się mieszaninę eutektyczną tymolu i borneolu zmieszane w ilościach od 6 do 9 części wagowych tymolu i od 4 do 1 części wagowych borneolu, stosując na 1 część wagową zmieloną kory brzozy od 80 do 120 części objętościowe mieszaniny eutektycznej; przy czym ekstrakcję prowadzi się co najmniej dwukrotnie, stosując za każdym razem świeżą porcją mieszaniny eutektycznej, w temperaturze od 50 do 80°C, po czym uzyskane ekstrakty łączy się i odparowuje.

Korzystnie kora brzozy jest rozdrobniona do wielkości cząstek co najwyżej do 1,6 mm.

Korzystnie gdy stosuje się mieszaninę zawierającą następujące ilości składników: 9 części wagowych tymolu do 1 części wagowej borneolu;

Korzystnie proces ekstrakcji prowadzi się trzykrotnie; w łaźni ultradźwiękowej.

Korzystnie otrzymany ekstrakt poddaje się liofilizacji.

Korzystnie liofilizat rozpuszcza się w octanie etylu, stosując na 1 część wagową liofilizatu od 5 do 7 części objętościowych korzystnie na 1 część wagową liofilizatu 5 części objętościowych octanu etylu, a następnie po przesączeniu i odparowaniu uzyskuje się koncentrat betuliny.

Zaletą rozwiązania według wynalazku w zakresie sposobu jest otrzymanie ekologicznego ekstraktu z kory brzozy zawierającego betulinę, mającego zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, opartego na nietoksycznych rozpuszczalnikach i tym samym eliminacja zanieczyszczenia preparatów kosmetycznych pozostałościami ekstrahentów charakteryzujących się znaczną toksycznością. Ponadto to rozwiązanie ma na celu rozwinięcie „zielonej technologii” produkcji kosmetyków. Sposób ekstrakcji według wynalazku jest więc przyjazną środowisku naturalnemu alternatywą izolacji betuliny z kory brzozy.

Rozpuszczalność betuliny w tych mieszaninach oraz najczęściej stosowanych w ekstrakcji związków naturalnych ekstrahentach zestawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Rozpuszczalność betuliny w wybranych rozpuszczalnikach wyrażona w procentach.

TB 6:4	TB 7:3	TB 8:2	TB 9:1	Metanol	Aceton	Chloroform
0,41	0,46	0,51	0,55	0,30	0,48	2,54

Pomimo iż rozpuszczalność betuliny w mieszaninach tymolu i borneolu jest mniejsza niż w chloroformie rozpuszczalność w mieszaninach TB 8:2 i TB 9:1 jest większa niż w metanolu i

acetonie, które to związki cechują się znaczną toksycznością. Proponowany sposób ekstrakcji jest więc przyjazną środowisku naturalnemu alternatywą izolacji betuliny z kory brzozy.

Przykład 1

Korę brzozy brodawkowatej wysuszono w suszarce laboratoryjnej w temp. 50°C a następnie zmielono w młynku laboratoryjnym uzyskując proszek o średnicy cząstek poniżej 1,6 mm. Tak przygotowana korę kilkakrotnie ekstrahowano metanolem w celu określenia całkowitej zawartości betuliny. Uzyskany ekstrakt przeanalizowano metodą HPLC stwierdzając, że kora zawiera 20,6% betuliny. Następnie 0,5 grama sproszkowanej kory ekstrahowano mieszaniną rozpuszczalników eutektycznych w ilości 20 ml, uzyskanym przez zmieszanie tymolu i borneolu w stosunku masowo-masowym 9:1. Ekstrakcję prowadzono w temperaturze 50°C w łaźni ultradźwiękowej w czasie 30 min. Po tym czasie mieszaninę zwirowano i uzyskany ekstrakt zdekantowano. Pozostałą substancję roślinną ponownie zalano 20 ml rozpuszczalnika eutektycznego TB 9:1 i ponownie ekstrahowano w tych samych warunkach czasowo-temperaturowych w łaźni ultradźwiękowej. Uzyskany ekstrakt zwirowano i zlano supernatant z nad substancji roślinnej, łącząc go z uprzednio otrzymanym ekstraktem. Całą procedurę powtórzono jeszcze raz stosując 10 ml mieszaniny TB 9:1. Połączone ekstrakty (50ml) zamrożono w temperaturze -80° i zliofilizowano uzyskując suchą pozostałość. Następnie suchą pozostałość rozpuszczono w 10 ml octanu etylu, przesączono, a uzyskany przesącz odparowano do sucha. W ten sposób uzyskano 160 mg koncentratu betuliny o zawartości betuliny 55,5%. Biorąc pod uwagę, że stężenie betuliny w zastosowanej korze brzozy wynosiło 20,6% ustalono, że wydajność ekstrakcji betuliny w warunkach opisanych w niniejszym przykładzie wyniosła 86,2%.

Przykład 2

Opisanym, w przykładzie pierwszym, sposobem prowadzono ekstrakcję betuliny za pomocą mieszaniny eutektycznej, stosując mieszaninę TB 8:2 przy czym na 0,5 grama sproszkowanej kory stosowano mieszaninę rozpuszczalników eutektycznych w ilości 25 ml. Całą procedurę powtórzono jeszcze dwa razy stosując: 25 ml a następnie 10 ml mieszaniny TB 8:2. Połączone ekstrakty (60ml) zamrożono w temperaturze -80° i zliofilizowano uzyskując suchą pozostałość.

Następnie zliofilizowaną suchą pozostałość rozpuszczono w 10 ml octanu etylu, przesączono i odparowano do sucha. Uzyskano 165 mg koncentratu betuliny o zawartości betuliny 53,8%. ustalono, że wydajność ekstrakcji betuliny w warunkach opisanych w niniejszym przykładzie wyniosła 86,2%.