

Badania nad ekstrakcją cyklicznych peptydów z materiałów odpadowych lnu zwyczajnego

Magdalena JEZIEWSKA-ZIĘBA, Barbara KĄKOL, Zygmunt BUJNOWSKI, Robert BRZOZOWSKI, Zbigniew DĄBROWSKI, Agnieszka KUCZYŃSKA, Mirosława SZPAKIEWICZ, Stefan SZARLIK, Jacek CYBULSKI – Instytut Chemii Przemysłowej, Warszawa

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2011, 65, 9, 837-848

Wstęp

Len, to jedna z najstarszych roślin uprawnych o nieocenionych wartościach zdrowotnych. Przyroda bogato wyposażyla len w odżywcze składniki roślinne poszukiwane przez człowieka. Już dawno stwierdzono, że częste jedzenie siemienia lnianego (minimum 10 g dziennie) chroni przed takimi chorobami, jak: miażdżyca, nadciśnienie, zawał serca, udar mózgu, zaćma. Zapobiega również pewnym rodzajom raka: piersi, błon śluzowych, macicy, prostaty i jelit. Osłania przewód pokarmowy (szczególnie żołądek) i działa przeczyszczająco. Stosuje się go w stanach zapalnych układu pokarmowego, w zaparciach, przy niezbytach dróg oddechowych. Obniża poziom cholesterolu i działa regenerująco na błony śluzowe. Wspomaga trawienie dzięki dużej zawartości błonnika. Zewnętrznie rozdrobnione nasiona można stosować w postaci okładów na ropnie i wrzody, które szybciej się goją.

Nasiona lnu zawierają ok.: 8% śluzów, od 30 do 40% oleju, 25% białka, glikozydy, sterole, enzymy, sole mineralne (żelaza, manganu, miedzi, cynku, kobaltu) [1].

Śluz roślinny znany jest jako naturalne powlekające substancje, roztwarzające się w wodzie na kleik o wysokiej lepkości i ciągliwości. Łagodzą one w naturalny sposób wpływ czynników drażniących błony śluzowe przewodu pokarmowego i oddechowego. Siemię lnu polecane jest w terapii chorób przewodu pokarmowego, oddechowego czy schorzeń dermatologicznych, gdzie wykorzystuje się działanie osłaniające, rozwalniające, zmiękczone i łagodzące śluzu lnianego. Na bazie zmodyfikowanego genetycznie lnu, zespół z Instytutu Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. Jana Szopy-Skórkowskiego opracował opatrunek, który okazał się zbawienny dla pacjentów borykających się z przewlekłymi owrzodzeniami pochodzenia żylnego czy odleżynami. Nowatorski opatrunek składa się z trzech składników: tkaniny, emulsji i ekstraktu z lnu [1].

Nasiona lnu zawierają również ok. 40% cennego oleju. Olej lniany jest unikalnym olejem roślinnym zawierającym ponad 90% nienasyconych kwasów tłuszczowych. Zawiera ok. 60% glicerydu kwasu linolowego, 20% glicerydu kwasu linolenowego, 5% glicerydu kwasu olejowego, 8% glicerydów kwasów nasyconych, 1% wolnych kwasów oraz witaminę E i inne związki.

Na uwagę zasługuje fakt, że olej ten zawiera ponad 50% kwasów tłuszczowych z rodziny omega 3, stanowiących bardzo ważne ogniwo w prawidłowych przemianach cholesterolu w organizmie człowieka. Kwasy tłuszczowe z rodziny omega 3, należące do grupy tzw. niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), są bardzo rzadko spotykane w innych olejach roślinnych. Większość powszechnie spożywanych olejów roślinnych zawiera prawie wyłącznie wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny omega 6. W miarę rozwoju cywilizacji pogłębia się przewaga spożywania kwasów omega 6 przy niedoborze kwasów omega 3, co jest główną przyczyną nasilających się obecnie chorób serca i układu krążenia.

Trzecim ważnym składnikiem nasion lnu jest bardzo wartościowe i lekkostrawne białko, którego siemię zawiera do 25%. Wskaźniki strawności białka lnu pod działaniem pepsyny i trypsyny należą

do jednych z najwyższych. Są wyższe nawet od wskaźników strawności białka mleka, a uzupełnienie białka lnu białkiem mleka pozwala na uzyskanie idealnej kompozycji aminokwasów.

Białko lnu jest bogate w aminokwasy egzogenne, a więc te składniki, które muszą być dostarczane z zewnątrz, a których brak może spowodować liczne zaburzenia w organizmie człowieka. Białko lnu, w porównaniu do białek innych roślin, zawiera dość znaczne ilości tryptofanu, aminokwasu egzogennego, którego brak wpływa niekorzystnie na wzrok oraz sprzyja powstawaniu chorób skórnych. W ostatnich latach z lnu wydzielono cykliczne peptydy [1], tzw. cyklopeptydy, składające się z 8 lub 9 połączonych cyklicznie cząsteczek aminokwasów. Mają one podobną budowę cząsteczki do cyklosporyny składającej się z 11 aminokwasów, która jest stosowana jako immunosupresor, konieczny przy transplantacjach.

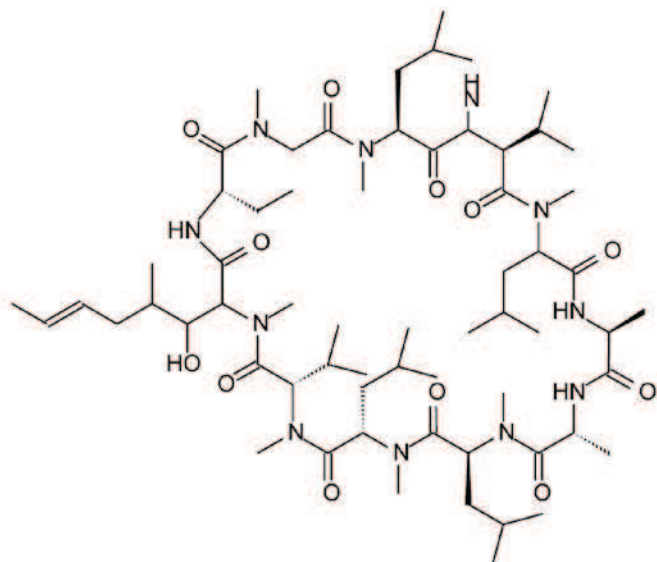
Wśród bioaktywnych składników lnu znajdują się również niedawno odkryte związki chemiczne z grupy tzw. fitohormonów – hormonów roślinnych określanych nazwą lignanów roślinnych [2, 3]. Lignany mogą występować w wielu gatunkach roślin; siemię lniane, zawiera przeciętnie 700 razy więcej tych substancji niż inne najczęściej spożywane produkty roślinne. Już wcześniej zwrócono uwagę na hormonozależność niektórych typów chorób nowotworowych, co spowodowało kolejne badania naukowe mające na celu przetestowanie ochronnego efektu diety bogatej w hormony roślinne wobec niektórych rodzajów nowotworów.

Ponieważ problem jest niezwykle interesujący, obserwujemy od kilku lat prawdziwą eksplozję badań naukowych dotyczących zależności pomiędzy dietą zawierającą siemię lnu a profilaktyką i leczeniem niektórych typów nowotworów u zwierząt i ludzi.

Jak dotąd uzyskano niezwykle obiecujące wyniki efektu ochronnego w poszczególnych typach i stadiach rozwoju chorób nowotworowych, autoimmunologicznych a także obu typów cukrzycy. Pojawiły się także doniesienia naukowe o korzystnym wpływie tej diety na objawy związane z menopauzą i osteoporozą. Obiecującym kierunkiem badań jest zastosowanie cyklopeptydów z lnu jako leki immunosupresyjne.

Immunosupresory są lekami hamującymi lub osłabiającymi odpowiedź immunologiczną. Wskazaniem do ich stosowania są przeszczepy narządów i tkanek oraz choroby immunologiczne. Działanie immunosupresyjne mają m.in.: hormony kory nadnerczy, antymetabolity hamujące procesy biosyntezy, leki alkilujące hamujące wytwarzanie przeciwciał, globulina antylimfocytarna zawierająca przeciwciała antylimfocytarne, cyklosporyna. Immunosupresory hamują proces wytwarzania w ustroju przeciwciał i komórek odpornościowych, czyli immunogenezę. W transplantologii używa się ich w celu osłabienia reakcji organizmu biorcy na przeszczepioną tkankę będącą dla niego antygenem. Podawanie immunosupresorów bezpośrednio po transplantacji zmniejsza ryzyko odrzucenia przeszczepu.

Znanym i stosowanym immunosupresorem jest cyklosporyna. Cyklosporyna A (rys. 1), substancja czynna leku, jest cyklicznym peptydem nierybosomalnym złożonym z 11 aminokwasów produkowanym przez grzyb *Tolypocladium inflatum*, oryginalnie wyizolowany z próbkki norweskiej ziemi.



Rys. 1. Struktura cyklosporyny A

Mechanizm działania cyklosporyny polega na wiązaniu się z cyklofiliną, cytozolem białkiem, w immunokompetentnych limfocytach, głównie typu T. Kompleks tych dwóch białek inhibuje kalcyneurynę (kalcineurynę), która w normalnych okolicznościach jest odpowiedzialna za aktywację transkrypcji interleukiny-2. Hamuje także produkcję limfokin i uwalnianie interleukin, co prowadzi do redukcji funkcji efektorów komórek T.

Niestety u osób przyjmujących cyklosporynę obserwuje się liczne działania niepożądane, które szczególnie występują u pacjentów leczonych ze wskazań transplantologicznych. Najczęstsze z nich to: zaburzenia czynności nerek, nadciśnienie tętnicze, drżenie, bóle głowy i hiperlipidemia. Dlatego ciągle poszukuje się nowych, lepszych immunosupresorów.

W nasionach lnu zwyczajnego stwierdzono obecność cyklicznych peptydów, którymi zainteresowano się ze względu na podobną do cyklosporyny budowę, co mogło sugerować potencjalne immunosupresyjne działanie.

Cyklopeptydy są to cykliczne nona- lub oktapeptydy o właściwościach hydrofobowych oraz o potencjalnym działaniu immunosupresyjnym.

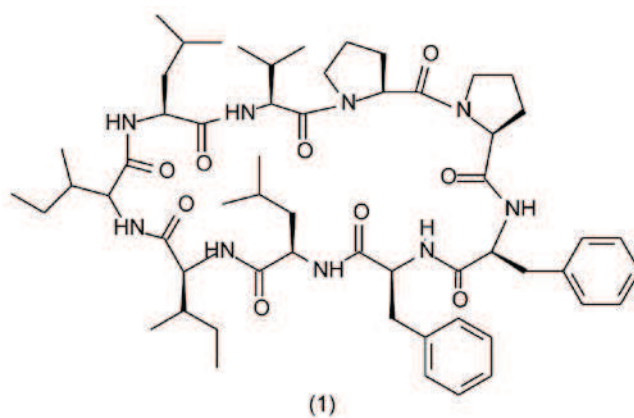
Cyklopeptyd A (CLA) został wyizolowany jako pierwszy w 1959 r. z surowego oleju lnianego przez Kaufmanna i Tobschirbela [1]. 10 lat później określono strukturę pierwszorzędową CLA (1) (rys. 2) jako cyklicznego nonapeptydu. Część cząsteczka CLA cyklo(PPFFLILV)nonapeptyd, zawiera kolejno dwie reszty aminokwasowe proliny, dwie fenyloalaniny, leucynę, dwie izoleucyny, leucynę oraz jedną resztę waliny. Natomiast cząsteczka CLB cyklo(PPFFVIMLI) (2) (rys. 2) [4] składa się kolejno z dwóch reszt aminokwasowych proliny, dwóch fenyloalanin, waliny, izoleucyny, metioniny, leucyny, izoleucyny.

Dla tych cyklicznych nonapeptydów określono zarówno wzajemne powiązanie aminokwasów jak i konfigurację wokół centrów chiralności, stosując metody spektrometrii mas, spektroskopii $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ oraz techniki dwuwymiarowej spektroskopii NMR (HMBC, NOESY).

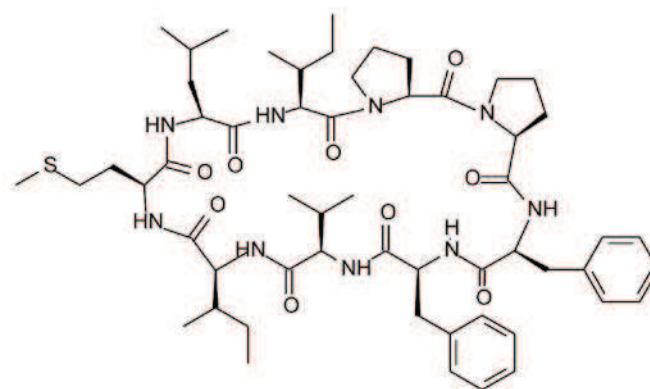
Dotychczas wydzielono i określono struktury dla 13 cyklicznych peptydów z nasion lnu. Są to cykliczne:

- nonapeptydy (CLA, CLB, CLC) [4]
- oktapeptydy (CLD, CLE, CLF, CLG, CLH, CLI, CLP, CLW, CLX) [4, 5]
- bicykliczny dekapeptyd (BCD).

Podobieństwo sekwencji aminokwasowej pomiędzy cyklosporyną a CLA sugerowało działanie immunosupresyjne cyklopeptydu, które zostało potwierdzone licznymi badaniami medycznymi [6, 7]. Stwierdzono, że mechanizm działania CLA na układ odpornościowy organizmu jest analogiczny do mechanizmu działania cyklosporyny.



(1)



(2)

Rys. 2. Struktury cyklopeptydów CLA (1) i CLB (2)

Na podstawie wstępnych badań medycznych stwierdzono również, że cyklopeptydy wykazują, w porównaniu do cyklosporyny, zbliżone działanie immunosupresyjne w niższych dawkach, mają dużo niższą toksyczność i nie powodują działań ubocznych. Na potwierdzenie tych badań trzeba jeszcze poczekać ze względu na czasochłonne i kosztowne badania medyczne, które odbywają się według ściśle określonych procedur.

Ponadto cyklopeptydy wykazują również inne korzystne działanie, np. przeciwnadkrytyczne [8].

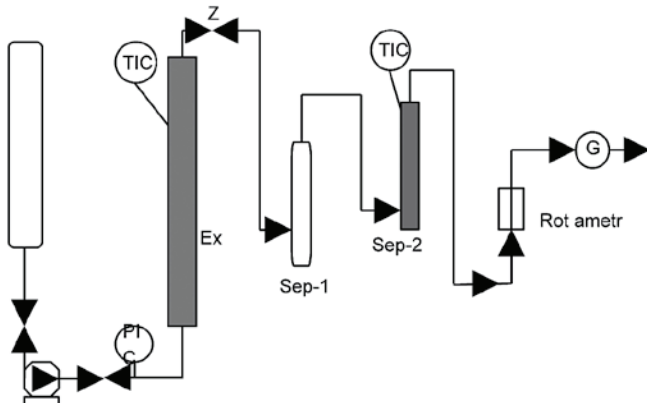
Nasze badania mają na celu wyodrębnienie z olejów lub z odpadowych plew frakcji cyklopeptydów i rozdzielenie ich na poszczególne składniki metodą chromatograficzną oraz identyfikację metodami spektroskopowymi [9]. Otrzymane frakcje cyklopeptydów poddane zostaną badaniu aktywności farmakologicznej w wybranych kierunkach. Do wyodrębniania cyklopeptydów z lnu zastosowano następujące metody:

- ekstrakcję CO_2 w stanie ciekłym lub nadkrytycznym
- ekstrakcję rozpuszczalnikową.

Badania nad ekstrakcją cyklicznych peptydów z makuchów i plew lnianych za pomocą CO_2 w stanie ciekłym lub nadkrytycznym

Ekstrakcja nadkrytyczna jest procesem wymiany masy, w którym zamiast klasycznych rozpuszczalników stosuje się sprężone gazy w warunkach nadkrytycznych. Ta forma ekstrakcji wykorzystuje pozytywną, z punktu widzenia procesów wymiany masy, cechę gazów i cieczy, jaką jest niska lepkość przy stosunkowo dużej gęstości. W wyniku tego ekstrahent posiada wysoką zdolność rozpuszczania oraz dobre własności penetracyjne. Zdolność rozpuszczania dla tego samego rozpuszczalnika zmienia się w szerokim zakresie i zależy od temperatury i ciśnienia prowadzenia procesu. Możliwy jest przypadek prowadzenia ekstrakcji ciekłym gazem, pod wysokim ciśnieniem i temperaturze niższej niż jego temperatura krytyczna.

Uproszczony schemat laboratoryjnej instalacji do badań procesów ekstrakcji nadkrytycznej przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 3. Schemat aparatury laboratoryjnej do ekstrakcji nadkrytycznej

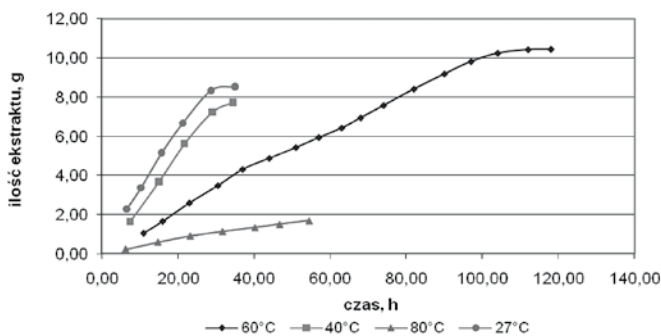
Rozpuszczalnik podawany jest z butli do ekstraktora pompą P, wyposażoną w manometr, współpracującą z układem regulacji ciśnienia PIC. Ekstraktor umieszczono w termostатовanej łaźni wodnej, dzięki czemu możliwe jest prowadzenie procesu w stałej, zadanej temperaturze. Na rurociągu wylotowym z ekstraktora znajduje się zawór rozprężający Z, utrzymujący ciśnienie w ekstraktorze. Bezciśnieniowy węzeł odbioru ekstraktu składa się z separatorów Sep-1, Sep-2 oraz układu pomiarowego ilości gazowego rozpuszczalnika. Chwilowy przepływ mierzony jest za pomocą rotametrów, a ilość całkowita – gazomierzem, oznaczonym na schemacie literą G. Ekstrakt cięższy zbierany jest do szklanych, wymiennych pojemników umieszczonych wewnątrz separatora Sep-1, a ekstrakt lekki do szklanych pojemników umieszczonych wewnątrz, chłodzonego za pomocą laboratoryjnego kriostatu do temp. -30°C , separatora Sep-2.

Badania ekstrakcji nadkrytycznej dotyczyły:

- wpływu temperatury i przepływu CO_2 na szybkość procesu ekstrakcji CO_2
- wpływu wstępnej ekstrakcji rozpuszczalnikowej wytypowanymi rozpuszczalnikami organicznymi na skład i ilość produktów uzyskiwanych w końcowej ekstrakcji CO_2
- frakcjonowania produktów ekstrakcji CO_2 w zależności od czasu trwania procesu.

Wpływ temperatury na szybkość ekstrakcji i na zawartość CLA z surowych makuchów lnianych za pomocą CO_2

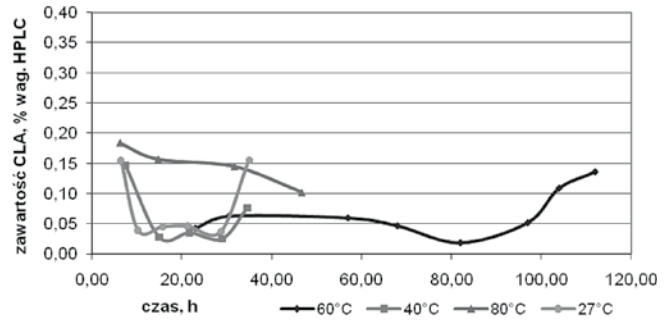
Badając wpływ temperatury na ekstrakcję surowych makuchów lnianych za pomocą CO_2 , wykonano próby w temp.: 80°C , 60°C , 40°C i 27°C pod ciśnieniem 20 MPa. Dla temperatur 80°C , 60°C i 40°C ekstrahentem był CO_2 w stanie nadkrytycznym, a w temperaturze 27°C , ekstrahentem był ciekły CO_2 . Do badań wykorzystano materiał odpadowy z lnu zwyczajnego odmiany „Modron” w postaci plew i makuchów.



Rys. 4. Wpływ temperatury na szybkość ekstrakcji

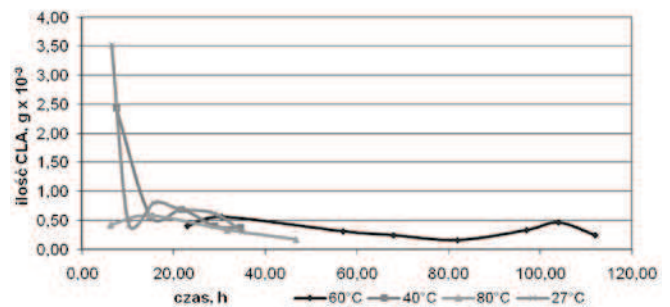
Proces ekstrakcji nadkrytycznej w temp. 60°C prowadzony był do praktycznego zaniku strumienia ekstraktu i trwał 118 h. Doświadczenie to przyjęto jako układ odniesienia dla ekstrakcji w pozostałych temperaturach. Dla porównania uzyskanych danych, wyniki doświadczeń przeliczono na 100 g wsadowego surowca roślinnego, a przyrost wagi ekstraktu w czasie odniesiono do ilości zużytego CO_2 . Wyniki przeprowadzonych doświadczeń przedstawiono w sposób graficzny na rysunku 4.

Uzyskane dane doświadczalne pokazują, że ekstrakcja makuchów lnianych ciekłym CO_2 prowadzona w temp. 27°C jest najszybsza i najbardziej wydajna. Wzrost temperatury ekstrakcji prowadzi do wyraźnego spowolnienia procesu. Wpływ temperatury i czasu prowadzenia procesu na zmianę stężenia CLA w poszczególnych próbkach ekstraktu, przedstawiono na rysunku 5.



Rys. 5. Zmiana stężenia CLA w zależności od czasu ekstrakcji

Zmieniające się ilości CLA, odbierane w kolejnych próbkach ekstraktu w zależności od czasu trwania ekstrakcji CO_2 , wyliczone zostały na podstawie analizy HPLC i wagi próbki. Ilość odbieranego CLA w ekstrakcie, w zależności od czasu ekstrakcji przedstawiono na rysunku 6.



Rys. 6. Ilość CLA w kolejnych frakcjach ekstraktu

Porównanie wyników doświadczalnych załączenia CLA w drodze ekstrakcji CO_2 surowych makuchów lnianych w różnych temperaturach pokazuje, że niższe temperatury procesu powodują wyraźny wzrost ilości CLA odbieranego w początkowych porcjach ekstraktu. W temperaturach wynoszących 27°C i 40°C , początkowe, stosunkowo wysokie stężenie CLA w ekstrakcie od 10-12 h procesu gwałtownie maleje. Ilości wagowe odbieranego ekstraktu są na początku procesu wyraźnie większe.

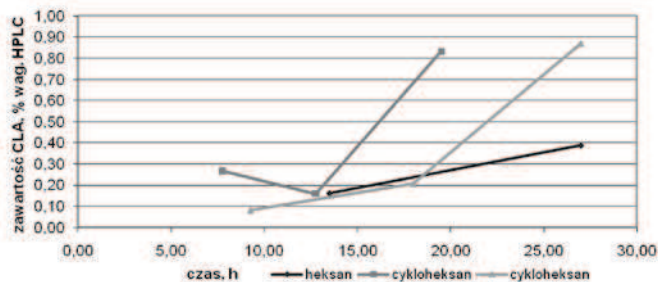
Wydaje się zatem, że w celu wstępnego załączenia strumienia CLA drogą ekstrakcji CO_2 surowych makuchów, proces powinien być prowadzony w niskiej temperaturze, nie dłużej niż 10-12 h.

Wpływ parametrów wstępnej ekstrakcji rozpuszczalnikowej na zawartość CLA w ekstraktach CO_2

W dalszych badaniach zastosowano wstępną ekstrakcję rozpuszczalnikową makuchów lnianych: heksanem, cykloheksanem i toluenem w temperaturach ich wrzenia. Następnie makuchy te poddano ekstrakcji za pomocą CO_2 . Spowodowało to prawie całkowite usunięcie wszystkich składników ekstrahowanych rozpuszczalnikami. Ilości ekstraktu uzyskane w drodze ekstrakcji nadkrytycznej CO_2 w każdej z tych prób były małe.

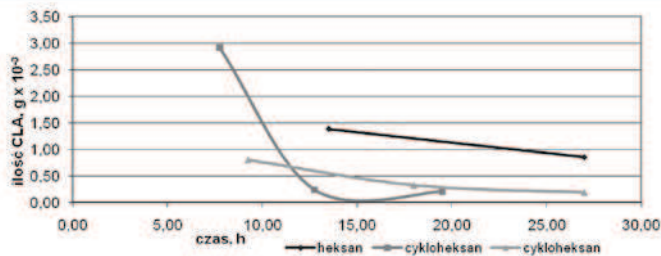
Ekstrakcję CO₂ makuchów lnianych, poddanych wstępnej ekstrakcji rozpuszczalnikowej, prowadzono w 60°C.

Wyniki oznaczonych zmian stężenia CLA w próbkach ekstraktu odbieranego w czasie trwania procesu ekstrakcji CO₂ oraz obliczonych na ich podstawie ilości CLA w poszczególnych próbkach przedstawiono na rysunku 7.



Rys. 7. Zmiana stężenia CLA w kolejnych próbkach ekstraktu CO₂ po wstępnej ekstrakcji rozpuszczalnikowej

Ilości CLA zawarte w kolejnych próbkach ekstraktu odebranych w czasie ekstrakcji CO₂, wyliczone na podstawie analiz HPLC oraz wagi próbek przedstawiono na rysunku 8.



Rys. 8. Zmiana ilości CLA zawartych w kolejnych próbkach ekstraktu

Wstępne ekstrakcje rozpuszczalnikowe makuchów lnianych, prowadzone w temperaturach wrzenia rozpuszczalników, spowodowały usunięcie poszukiwanych przez nas składników. Ilości ekstraktu uzyskane w drodze późniejszej ekstrakcji tych makuchów za pomocą nadkrytycznego CO₂ były zbyt małe, aby mogły być wykorzystane do dalszej izolacji CLA.

Porównanie wyników ekstrakcji nadkrytycznych za pomocą CO₂ makuchów surowych i poddanych wstępnej ekstrakcji rozpuszczalnikowej w temperaturze pokojowej, pokazuje, że dla heksanu i cykloheksanu uzyskano nieznaczny wzrost średniego stężenia CLA w ekstrakcie CO₂.

Po przeprowadzeniu kilku doświadczeń stwierdzono, że użyte w badaniach rozpuszczalniki ekstrahują cyklopeptydy razem z olejem.

Czasy całkowite prowadzenia ekstrakcji CO₂ po wstępnej ekstrakcji rozpuszczalnikowej, skracają się z 118 h – w przypadku makuchów surowych, do 30 h. Ilość CLA zawartego kolejnych porcjach ekstraktu maleje w porównaniu z ekstrakcją CO₂ makuchów surowych.

Powtarzalność procesu ekstrakcji makuchów lnianych za pomocą CO₂

W celu dokonania oceny powtarzalności procesu ekstrakcji CO₂, porcję makuchów lnianych poddanych wstępnej ekstrakcji rozpuszczalnikowej cykloheksanem w temperaturze pokojowej, podzielono na dwie porcje. Każdą z nich poddano osobno ekstrakcji CO₂ w warunkach nadkrytycznych, w temp. 60°C i ciśnieniu 20,0 MPa. W pierwszym przypadku ekstrakt zbierano do pojemnika łącznie, notując przyrost wagi ekstraktu w czasie. W doświadczeniu drugim porcję ekstraktu zbierano i ważono oddzielnie. W próbkach ekstraktu oznaczono stężenie CLA.

Na podstawie wyników oznaczeń i wagi otrzymanych ekstraktów sporządzono bilans wagowy łącznej, otrzymanej w każdej próbie, ilo-

ści CLA. W doświadczeniu drugim, na podstawie sumarycznej ilości CLA w każdej z trzech próbek i łącznej wagi ekstraktu, wyliczono stężenie końcowe. Uzyskany wynik obliczeń stężenia końcowego różnił się o 0,002 od wartości stężenia oznaczonego metodą HPLC w ekstrakcie odebranym w całości (w jednej porcji) z doświadczenia pierwszego. W wyniku obu przeprowadzonych doświadczeń, w podobnym czasie, uzyskano zbliżone wagowo ilości ekstraktu.

Zbieżne wyniki ekstrakcji identycznego surowca uzyskane w obu próbach świadczą o powtarzalności badanych procesów.

Badania nad ekstrakcją cyklicznych peptydów z makuchów i plew lnianych tradycyjnymi rozpuszczalnikami

W ramach pracy podjęto próbę wyizolowania cyklicznych peptydów tradycyjnymi rozpuszczalnikami organicznymi. Do badań wytypowano rozpuszczalniki, takie jak: heksan, cykloheksan, metanol i toluen. Proces ekstrakcji prowadzono periodycznie z użyciem rozpuszczalników w temperaturze pokojowej i w ich temperaturze wrzenia. Jako surowce stosowano plewy i makuchy lniane.

Badania rozpoczęto od przeprowadzenia ekstrakcji cyklicznych peptydów z makuchów lnianych z zastosowaniem heksanu w temperaturze wrzenia w aparacie Soxhleta. Ekstrakcję prowadzono przez 14 h; w jej wyniku uzyskano, po odparowaniu rozpuszczalnika, 15,06% ekstraktu w przeliczeniu na użyty surowiec. Ekstrakt zawierał 0,085% CLA. Następnie sprawdzono efektywność ekstrakcji cyklicznych peptydów z makuchów za pomocą heksanu w temperaturze pokojowej. Ekstrakcja heksanem trwała 6 h, a w jej wyniku uzyskano 13,97% ekstraktu o zawartości 0,016% CLA. Zaobserwowano, że heksan w temperaturze pokojowej ekstrahuje zbliżoną ilość ekstraktu w porównaniu do temperatury wrzenia, który zawiera pięciokrotnie mniej cyklopeptydu CLA. Podwyższenie temperatury ekstrakcji do temperatury wrzenia rozpuszczalnika (69°C) powoduje niewielki wzrost ilości ekstraktu o 1,1% i wzrost zawartości CLA o 0,069%.

Te same makuchy wstępnie wyekstrahowane heksanem w temperaturze pokojowej ekstrahowano toluenem lub metanolem w temperaturze wrzenia. W wyniku ekstrakcji toluenem, po odparowaniu rozpuszczalnika, otrzymano 2,55% ekstraktu zawierającego 0,5% CLA. Natomiast w wyniku działania gorącym metanolem otrzymano ekstrakt stanowiący 9,03% masy makuchów i zawierający 0,001% CLA.

Zaobserwowano, że metanol w temperaturze wrzenia pozwala uzyskać dużą ilość ekstraktu o bardzo małej zawartości CLA w porównaniu do toluenu, który daje niewielką ilość ekstraktu o dużej zawartości CLA. Toluen w temperaturze wrzenia dużo lepiej ekstrahuje CLA w porównaniu z metanolem.

Porównano zawartość CLA w ekstraktach uzyskanych z zastosowaniem cykloheksanu w temperaturze pokojowej i temperaturze wrzenia. W wyniku ekstrakcji cykloheksanem w temperaturze pokojowej uzyskano 8,35% ekstraktu o zawartości 0,037% CLA. Natomiast ekstrakcja wrzącym cykloheksanem pozwoliła na uzyskanie materiału stanowiącego 10,06% początkowej masy makuchów, zawierającego 0,083% CLA.

Cykloheksan w temperaturze wrzenia ekstrahuje dwa razy więcej cyklopeptydu CLA w porównaniu do temperatury pokojowej. Jednocześnie w temperaturze pokojowej ma dwukrotnie wyższą zawartość CLA w porównaniu do heksanu.

Zawartość cyklopeptydów w materiale roślinnym jest bardzo mała i nie przekracza 0,02%; ponadto makuchy zawierają jeszcze ok. 10% oleju, który zmienia rozpuszczalność cyklopeptydów i wpływa na ich ekstrakcję.

W celu wydobycia maksymalnej ilości CLA postanowiono wykonać wielokrotną ekstrakcję tego samego materiału roślinnego. W pierwszym etapie makuchy lniane poddano ekstrakcji toluenem w temp. 20°C w celu wyekstrahowania oleju lnianego. Otrzymany ekstrakt stanowił 7,26% wyjściowej masy zastosowanego materiału roślinnego i zawierał 0,17% CLA. Następnie makuchy poddano

trzykrotnej ekstrakcji toluenem w temp. 90°C. Uzyskane ekstrakty stanowiły kolejno 2,33%, 0,55% oraz 0,23% masy makuchów lnianych.

Sumarycznie wyekstrahowano 22,30 mg CLA ze 100 g makuchów.

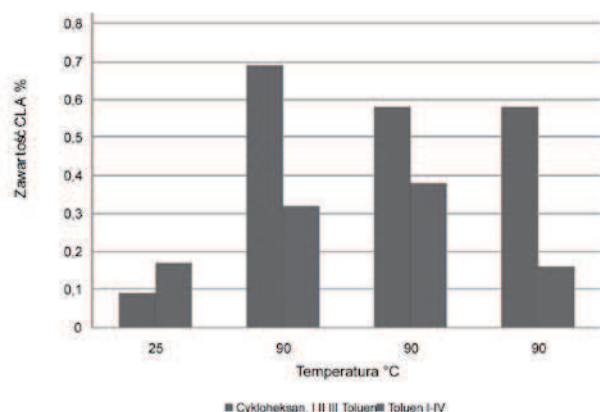
Toluen w temperaturze pokojowej wyekstrahował 0,170% CLA. Natomiast podwyższenie temperatury do 90°C wpłynęło na wzrost zawartości CLA do 0,293% masy ekstraktu.

Ekstrakcja toluenem w temperaturze pokojowej spowodowała, że razem z olejem lnianym nastąpiło wydobycie znacznej ilości cyklicznych peptydów (0,32%).

W następnym doświadczeniu, do wstępnej ekstrakcji oleju zastosowano cykloheksan. Ekstrakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 13 h; w wyniku tego procesu otrzymano 8,35% ekstraktu o zawartości 0,091% CLA. Następnie te same makuchy ekstrahowano trzykrotnie toluenem w temp. 90°C. Ekstrakty stanowiły kolejno 1,57%, 0,30% oraz 0,18% masy makuchów lnianych. Wszystkie uzyskane ekstrakty poddano analizie metodą HPLC dla oznaczenia ilości cyklopeptydów, otrzymując następujące wyniki: ekstrakt toluenowy I – 0,69%, II – 0,58% i III – 0,58% CLA.

Sumarycznie otrzymano 20,02 mg CLA ze 100 g makuchów.

W obu doświadczeniach uzyskano bardzo zbliżoną sumaryczną ilość cyklopeptydu CLA. Zastosowanie cykloheksanu do wstępnej ekstrakcji oleju spowodowało, że ekstrakty toluenowe zawierały więcej o 7,4 mg CLA w porównaniu do eksperymentu, w którym do wstępnej ekstrakcji użyto toluen. Wyniki omawianych eksperymentów zilustrowano na rysunku 9.



Rys. 9. Wyniki ekstrakcji rozpuszczalnikowej makuchów lnianych

Drugim surowcem odpadowym zastosowanym do badań były lniane plewy. W celu określenia zawartości CLA w plewach lnianych i porównania jej z zawartością tych peptydów w makuchach lnianych, przeprowadzono doświadczenie w warunkach podobnych jak dla makuchów lnianych.

Ekstrakcję z plew lnianych prowadzono ze wstępną ekstrakcją materiału roślinnego heksanem przez 7 h w temperaturze pokojowej, a następnie trzykrotnie ekstrahowano toluenem przez 7-8 h w temperaturze wrzenia. Ekstrakt heksanowy stanowił 0,91% masy użytych plew o zawartości CLA równej 0,001%. Ekstrakcje prowadzone z zastosowaniem toluenu stanowiły kolejno: 1,68%, 0,57% i 0,49% w przeliczeniu na masę użytego surowca, a zawartość CLA w ekstraktach wynosiła odpowiednio: 0,144%, 0,044% i 0,005%. W sumie otrzymano 3,64 g ekstraktu z wydajnością 3,64% w przeliczeniu na początkową masę plew.

Sumarycznie ekstrakty z plew zawierają 2,67 mg CLA.

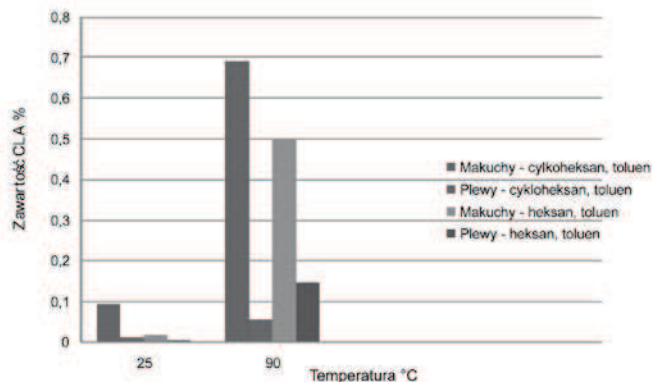
Natomiast w zbliżonych warunkach z makuchów lnianych uzyskano sumarycznie 15,23 mg CLA (w ekstrakcie heksanowym 2,23 mg CLA, a w ekstrakcie toluenowym ok. 13 mg CLA).

Zawartość CLA w plewach lnianych okazała się bardzo mała i dla potwierdzenia tego wyniku wykonano dodatkową ekstrakcję w identycznych warunkach z zastosowaniem nowej partii surowca.

Ekstrakcję z plew prowadzono ze wstępnym odolejeniem materiału cykloheksanem w temperaturze pokojowej, a następnie toluenem w temperaturze wrzenia. Ekstrakt cykloheksanowy stanowił 0,03% masy użytych plew, o zawartości CLA równej 0,010%. Natomiast zawartość CLA w ekstrakcie toluenowym wynosiła 0,053% masy ekstraktu uzyskanego z wydajnością 1,39%. W sumie otrzymano 1,42 g ekstraktu (co stanowi 1,42% początkowej masy plew).

Sumarycznie ekstrakty zawierają 0,743 mg CLA.

Graficzne porównanie otrzymanych danych dla makuchów i plew lnianych przedstawiono na rysunku 10.

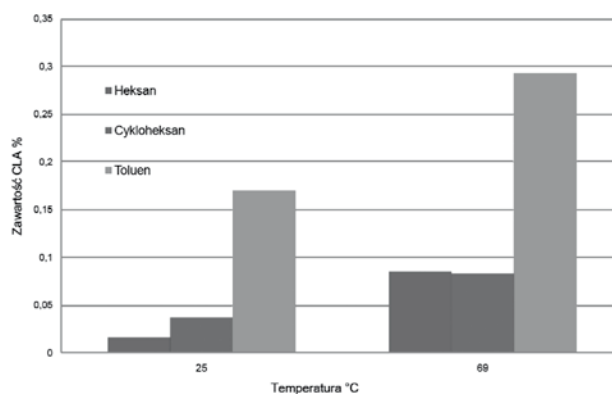


Rys. 10. Wyniki ekstrakcji rozpuszczalnikowej plew i makuchów lnianych

Z otrzymanych danych wynika, że zawartość CLA w plewach jest dużo niższa w porównaniu do zawartości CLA w makuchach lnianych. Najkorzystniejszy wynik ekstrakcji CLA z makuchów lnianych uzyskano z zastosowaniem wstępnej ekstrakcji cykloheksanem w temperaturze pokojowej, a następnie trzykrotną ekstrakcją toluenem w temperaturze wrzenia.

Dane zebrane z powyższych doświadczeń wskazują, iż zastosowanie we wstępnej ekstrakcji rozpuszczalnikowej heksanu, cykloheksanu i toluenu w temperaturze pokojowej, w celu usunięcia oleju, powoduje częściowe wymycie CLA w poszczególnych ekstrakcjach. Najwyższą ilość CLA zawiera ekstrakt toluenowy (0,17%), a dwukrotnie mniejszą ekstrakt cykloheksanowy (0,09%) i dziesięciokrotnie mniejszą heksanowy (0,016%).

We wszystkich przypadkach, w których zastosowano wstępną ekstrakcję oleju z surowego materiału roślinnego, obok olejowych kwasów tłuszczowych i ich glicerydów zawsze były obecne cyklopeptydy. Prawdopodobnie oleje roślinne zwiększają rozpuszczalność CLA w rozpuszczalnikach niepolarnych, nawet w temperaturze pokojowej. Wyniki tych doświadczeń przedstawiono na rysunku 11.



Rys. 11. Zależność stężenia CLA od rodzaju rozpuszczalnika i temperatury ekstrakcji

Ekstrakt uzyskany heksanem w temperaturze pokojowej zawierał 0,016% CLA. Natomiast w temperaturze wrzenia zawartość CLA w ekstrakcie wynosiła 0,085%.

W przypadku zastosowania cykloheksanu, zawartości CLA w ekstrakcie otrzymanym w temperaturze pokojowej wynosiła 0,037%, a w temperaturze wrzenia 0,083%.

Podsumowanie

Cyklopeptydy wydzielono z makuchów i plew lnianych (*Linum usitatissimum* L.). Wydzielanie prowadzono dwiema metodami: ekstrakcją za pomocą nadkrytycznego CO₂ i tradycyjną ekstrakcją rozpuszczalnikową.

Przeprowadzono badania zależności wydajności ekstrakcji cyklopeptydów za pomocą CO₂ od temperatury. Stwierdzono, że najwyższą wydajność cyklopeptydu CLA (0,006%) otrzymuje się w temp. 25-40°C pod ciśnieniem 20 MPa z makuchów surowych. Ekstrakt zawiera 0,08% cyklopeptydu CLA.

Wydajność ekstrakcji cyklopeptydu CLA za pomocą CO₂ makuchów (po wstępnej ekstrakcji cykloheksanem) wynosi 0,001%, a stężenie w ekstrakcie jest wyższe i wynosi 0,11%.

Do badań nad opracowaniem najefektywniejszej metody pozyskania cyklopeptydu CLA w ekstrakcji rozpuszczalnikowej zastosowano trzy rozpuszczalniki: toluen, heksan, cykloheksan w temperaturze pokojowej i temperaturze wrzenia. Badania wykazały, że wysoka temperatura rozpuszczalników zwiększa zawartość cyklopeptydu CLA w otrzymanych ekstraktach.

Opracowano metodę, która pozwala na otrzymanie największej ilości cyklopeptydu CLA z makuchów lnianych. Polega ona na wstępnej ekstrakcji cykloheksanem w temperaturze pokojowej, a następnie trzykrotnej ekstrakcji toluenem w temperaturze wrzenia. Wstępna ekstrakcja ma na celu usunięcie z makuchów resztek oleju. Ten sposób pozwolił na wyodrębnienie 0,02% cyklopeptydu CLA z materiału roślinnego. Produkt zawierał 0,66% cyklopeptydu CLA.

W przypadku plew lnianych obie zastosowane metody ekstrakcji, za pomocą CO₂ i ekstrakcji rozpuszczalnikowej, dały porównywalną ilość ekstraktu 1,4-1,7% masy surowca. Natomiast stężenie cyklopeptydu CLA w ekstraktach jest różne i wynosi w ekstrakcie CO₂ 0,01%, a w ekstrakcie rozpuszczalnikowym 0,05%.

Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono, że procesy ekstrakcji za pomocą CO₂, jak również ekstrakcji rozpuszczalnikowej, mogą być stosowane jako podstawa technologii izolacji cyklopeptydów z lnu.

Na podstawie identyfikacji stwierdzono, że ekstrakt uzyskany za pomocą CO₂ zawiera głównie cyklopeptyd CLA (ok. 80%), natomiast ekstrakt rozpuszczalnikowy obok cyklopeptydu CLA – porównywalne ilości cyklopeptydu CLE.

Literatura

- Kozłowska J.: Wiadomości Aptekarskie 2000, 7, 19; Kaufmann H. P., Tob-schirbel A.: *Über ein Oligopeptid aus Leinsamen*. Chem. Ber. 1959, 92, 2805; Naider F., Benedeti E., Goodman M.: *Conformation of cyclolinopeptide A observed by circular dichroism*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1971, 68, 1195; Chat-trij D., Sankaram M.B., Balasubramanian D.: *Conformational and ion-binding properties of cyclolinopeptide A isolated from linseed*. J. Biosci. 1987, 11, 473.
- Degenhardt A., Habben S., Winterhalter P.: *Isolation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed (Linum usitatissimum L.) by high-speed counter-current chromatography*. J. Chrom. 2002, 943, 299.
- Koulman A., Konuklugil B.: Bioch. Sys. Biol. 2004, 32, 91.
- Morita H., Shishido A., Matsumoto T., Itokawa H., Takeya K.: *Cyclolinopeptides B-E, new cyclic peptides from Linum usitatissimum*. Tetrahedron 1999, 55, 967.
- Matsumoto T., Shishido A., Morita H., Itokawa H., Takeya K.: *Cyclolinopeptides F-I, cyclic peptides from linseed*. Phytochem. 2001, 57, 251.
- Picur B., Cebrat M., Zabrocki J., Siemion I.Z.: *Cyclopeptides of Linum usitatissimum*. J. Peptide Sci. 2006, 12 (9), 569.
- Siemion I.Z., Cebrat M., Wieczorek Z.: *Cyclolinopeptides and their analogs - a new family of peptide immunosuppressants affecting the calcineurin system*. Archiv. Immunol. Therap. Experim. 1999, 47, 143.
- Bell A., McSteen P.M., Cebrat M., Picur B., Siemion I.Z.: *Antimalarial activity of cyclolinopeptide A and its analogues*. Acta. Pol. Pharm. 2000, 57, 134.
- Zgłoszenie patentowe w przygotowaniu.

Dr inż. Magdalena JEZERSKA-ZIĘBA jest absolwentką Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej (2001). Doktorat uzyskała w Instytucie Chemii Przemysłowej (2009). Od 2001 r. pracuje w Instytucie Chemii Przemysłowej, obecnie na stanowisku adiunkta. Jest autorką i współautorką 8. artykułów w prasie naukowo-technicznej, autorką lub współautorką 36. referatów i posterów na konferencjach krajowych i zagranicznych. Specjalność – synteza organiczna.

Mgr inż. Barbara KĄKOL ukończyła Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej (1975). Od 1987 r. pracuje w Instytucie Chemii Przemysłowej, obecnie na stanowisku st. specjalisty badawczo-technicznego. Jest autorką i współautorką 17. artykułów w prasie naukowo-technicznej, autorką lub współautorką 74. referatów i posterów na konferencjach krajowych i zagranicznych. Specjalność – synteza organiczna.

Mgr inż. Zygmunt BUJNOWSKI ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, Filia w Płocku (1978). Przez wiele lat pracował w nadzorze produkcji w przemyśle farmaceutycznym w TZF Polfa, m.in. na stanowiskach kierownika oddziału produkcyjnego, zastępcy kierownika Zakładu Syntez i Biosyntez oraz zastępcy dyrektora zakładu ds. produkcji. Obecnie pracuje na stanowisku specjalisty w Instytucie Chemii Przemysłowej im. Prof. Mościckiego w Warszawie. Specjalność: chemia i technologia chemiczna.

Dr inż. Robert BRZOZOWSKI jest absolwentem Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, Filia w Płocku (1981). Doktorat uzyskał w Instytucie Chemii Przemysłowej (2001). Obecnie pracuje w Instytucie Chemii Przemysłowej jako adiunkt. Jest autorem i współautorem 30. artykułów w prasie naukowo-technicznej, autorem lub współautorem 40. referatów i posterów na konferencjach krajowych i zagranicznych. Specjalność: chemia i technologia organiczna.

Mgr Zbigniew DĄBROWSKI ukończył Wydział Matematyczno-Przyrodniczy Filii Uniwersytetu Warszawskiego w Białymstoku (1996). Od 1998 r. pracuje w Instytucie Chemii Przemysłowej, obecnie na stanowisku asystenta. Jest autorem i współautorem 10. artykułów w prasie naukowo-technicznej, autorem lub współautorem 23. referatów i posterów na konferencjach krajowych i zagranicznych. Specjalność – synteza organiczna.

Mgr Agnieszka KUCZYŃSKA jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Od 2009 r. pracuje w Instytucie Chemii Przemysłowej, obecnie na stanowisku specjalisty. Specjalność – synteza organiczna.

Tech. Mirosława SZPAKIEWICZ ukończyła Technikum Chemiczne o specjalności technolog przemysłu chemicznego w Nowym Dworze Mazowieckim (1970). Od 1970 r. pracuje w Instytucie Chemii Przemysłowej, obecnie na stanowisku st. technika. Jest współautorką 4. artykułów w prasie naukowo-technicznej i 9 posterów na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Dr inż. Stefan SZARLIK, kierownik Zakładu Technologii Organicznej Instytutu Chemii Przemysłowej, ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej (1970) (specjalizacja projektowanie technologiczne). Zatrudniony od 1970 r. w IChP. Specjalność zawodowa: technologiczna i powiększanie skali procesów przemysłowych. Autor wdrożeń z zakresu technologii kaprolaktamu i kwasu adypinowego w Polsce i za granicą.

Prof. dr hab. Jacek CYBULSKI jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (1968). W 1975 r. uzyskał stopień doktora nauk chemicznych, a w 1986 r. stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych. W 1999 r. otrzymał tytuł profesora nauk farmaceutycznych. Od 2004 r. jest kierownikiem Zakładu Lekkiej Syntezy Organicznej w Instytucie Chemii Przemysłowej. Jest autorem i współautorem 64. prac publikowanych w czasopiśmie krajowych i zagranicznych, współautorem 81. referatów i komunikatów oraz 31. posterów na zjazdach krajowych i zagranicznych, współautorem podręczników „Preparatyka i elementy syntezy organicznej” oraz „Metody i techniki pomiarowe w spektroskopii oscylacyjnej”, współautorem 3. opracowań monograficznych oraz współautorem 37. patentów i 23. zgłoszeń patentowych.