

Monika Waksmundzka-Hajnos, Anna Oniszczyk*, Rafał Podgórski

Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Wydział Farmaceutyczny,
Katedra Chemii, Zakład Chemii Nieorganicznej,
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin,
*e-mail: aoniszczyk@o2.pl

Wpływ rodzaju i parametrów ekstrakcji na wydajność izolacji wybranych furanokumaryn z owoców gorysza wyniosłego (*Peucedanum verticillare*)

Streszczenie: Analiza materiału roślinnego jest ważnym zadaniem w poszukiwaniu roślin o działaniu farmakologicznym a także w standaryzacji leków roślinnych. Celem każdego procesu ekstrakcji jest szybka i skuteczna izolacja związków z matrycy przy użyciu minimalnej ilości rozpuszczalnika. Celem przedstawionej pracy był wybór optymalnych warunków do analizy materiału roślinnego oraz zbadanie wpływu metody ekstrakcji na wydajność izolacji niektórych furanokumaryn z owoców gorysza wyniosłego. Furanokumaryny mają istotne zastosowanie w lecznictwie. Są między innymi wykorzystywane w terapii bielactwa i łuszczycy oraz leczeniu skórno T-komórkowego chłoniaka z erytmodermią.

Zastosowano następujące metody ekstrakcyjne: wyczerpująca ekstrakcja w aparacie Soxhleta, ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami w temperaturze 20 i 60°C oraz ekstrakcja wspomaganą mikrofalami w układzie otwartym i zamkniętym. Analiza została przeprowadzona metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV/VIS. Wyniki wskazują, że najwyższą wydajność imperatoriny uzyskano w wyniku ekstrakcji ultradźwiękowej 60°C, natomiast metodą najskuteczniejszą do izolacji umbeliferonu okazała się ekstrakcja mikrofalowa w układzie zamkniętym.

Słowa kluczowe: furanokumaryny, gorysz wyniosły, ekstrakcja ciało stałe – ciecz, wysokosprawna chromatografia cieczowa

Influence of the extraction type on the yield of some furanocoumarins from *Peucedanum verticillare* fruits

Abstract: Analysis of plant material is an important task in chemotaxonomical investigations, particularly, in search of plants with pharmacological activity or in standardisation of plant drugs. The goal of every extraction process is rapid and effective isolation of compounds from a matrix by use of minimum amount of solvent. The aim of this paper was the choice of optimal conditions for the analysis of plant material and effect of extraction method on the yield of some furanocoumarins from *Peucedanum verticillare* fruits. Furanocoumarins have important uses in human medicine and exhibit toxicity against a wide range of organisms. This group of compounds reveal pharmacological activity. They are important drugs in vitiligo and psoriasis therapy and are also used in therapy erythrodermic variants of cutaneous T-cell lymphoma and chronic graft-versus-host disease.

The following extraction methods were used in our experiments: exhaustive extraction in Soxhlet apparatus, ultrasound-assisted solvent extraction (USAE) at 20 and 60°C as well as microwave-assisted solvent extraction in open and closed system (MASE). Target compounds analysis was performed by high performance liquid chromatography with UV/VIS detector. The results indicated that, the highest yield of imperatorin can be obtained by ultrasonication at 60°C, while microwave-assisted solvent extraction in closed system is very efficient in the extraction of umbelliferone.

Keywords: furanocoumarins, *peucedanum verticillare*, solid-liquid extraction, high performance liquid chromatograph

1. Wstęp (Introduction)

W całym toku analizy wstępna obróbka surowców jest jednym z bardziej czasochłonnych procesów, a szczególnie dotyczy to próbek stałych [1].

Techniki ekstrakcyjne nie są bezpośrednio metodami analizy ilościowej, ale mają duże znaczenie jako metody przygotowania próbek do analizy. Ekstrakcja rozpuszczalnikiem stałej próbki, powszechnie znana jako ekstrakcja ciało stałe - ciecz (LSE liquid - solid extraction) lub ługowanie jest procesem, jakiemu poddaje się na początku analizowany materiał. Celem każdej techniki ekstrakcyjnej jest szybkie i efektywne wyizolowanie pożądanego substancji z matrycy, przy użyciu jak najmniejszej ilości rozpuszczalników [2].

Przedmiotem niniejszych badań były wybrane furanokumaryny pochodzące z owoców gorysza wyniosłego (*Peucedanum verticillare*). Związki kumarynowe stanowią rozpowszechnioną w świecie roślinnym grupę metabolitów wtórnych, szeroko stosowanych w lecznictwie. Ważne właściwości lecznicze posiadają zwłaszcza furanokumaryny. Jest to tzw. działanie fotosensybilizujące, wykorzystywane w leczeniu bielactwa nabytego skóry (vitiligo), znane już przed setkami lat przez Egipcjan i Indian [3]. Poza działaniem fotouczulającym kumaryny posiadają zdolność hamowania syntezy DNA, co w skojarzeniu z promieniowaniem UV (324–400 nm i 232–325 nm) wykorzystuje się w leczeniu łuszczycy (psoriasis). Spora grupa furanokumaryn wykazuje aktywność przeciwwgrzybiczną oraz bakteriostatyczną [4, 5].

Aktywność biologiczna i farmakologiczna kumaryn jest bardzo zróżnicowana i uzależniona od ich struktury chemicznej. W leczeniu chorób układu krążenia wykorzystuje się działanie rozkurczające naczynia wieńcowe, obniżające ciśnienie krwi oraz stężenie cholesterolu i lipidów we krwi, tonizujące naczynia włosowate. Niektóre kumaryny posiadają właściwości blokowania kanałów wapniowych w mięśniu sercowym oraz w naczyniach obwodowych [4-7].

Właściwości spazmolityczne opisywanej grupy związków są wykorzystywane w schorzeniach dróg żółciowych. Działają one ponadto żółciopędnie i żółciotwórczo. Niektóre z nich posiadają aktywność przeciwbólową, przeciwzapalną, przeciwobrzękową i przeciwgorączkową, co związane jest z hamującym wpływem na cyklooksygenazę.

Badania prowadzone w ostatnich latach ujawniły immunosupresyjne, diuretyczne [4, 8] oraz ochronne na wątrobę działanie kumaryn. Znane jest również działanie kumaryn na OUN. Niektóre z nich (np. 4-metylo-7-hydroksy-8-piperidyno-metylokumaryna) działają pobudzająco na ośrodkowy układ nerwowy, inne (angelicyna) wykazują działanie sedatywne i hipnotyczne [4, 6, 9].

Należy również wspomnieć, iż związki te, a zwłaszcza furanokumaryny i piranokumaryny, pełnią funkcję ochronną dla roślin [6].

W procesie ekstrakcji/ługowania metabolitów wtórnych z materiału roślinnego stosowanych jest wiele technik tradycyjnych jak: perkolacja, eks-

trakcja w aparacie Soxhleta, ekstrakcja metodą ogrzewania na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Obecnie coraz częściej spotykane są prace z wykorzystaniem do tego celu technik nowoczesnych takich jak: ekstrakcja wspomagana mikrofalami (MASE), ultradźwiękami (USAЕ), technika z wymuszonym przepływem rozpuszczalnika (ASE lub PLE) czy też ekstrakcja cieczą w stanie nadkrytycznym (SFE) oraz ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika próbki zmieszanej z wypełniaczem (MSPD) [10-12].

Celem niniejszej pracy było porównanie metod ekstrakcyjnych takich jak: ekstrakcja w aparacie Soxhleta, ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami w temperaturze 20°C i 60°C oraz ekstrakcja wspomagana mikrofalami w układzie otwartym i zamkniętym w odniesieniu do wybranych furanokumaryn pochodzących z owoców gorysza wyniosłego pod kątem wydajności ekstrakcji, powtarzalności wyników, czasu i zużycia rozpuszczalników.

2. Część eksperymentalna ***(The experimental part)***

2.1. Materiały i odczynniki ***(Materials and reagents)***

Dojrzałe owoce gorysza wyniosłego zebrano w Ogrodzie Farmakognostycznym UM w Lublinie. Wzorce kumaryn: umbeliferon i imperatorynę zakupiono w firmie Fluka, Buchs, Szwajcaria. Eter naftowy oraz metanol do przeprowadzenia ekstrakcji (cz.d.a) pochodziły z firmy POCh, Gliwice, Polska, metanol do chromatografii z firmy E. Merck, Darmstadt, Niemcy.

2.2. Metodyka ***(Methodology)***

2.2.1. Ekstrakcja w aparacie Soxhleta ***(Soxhlet extraction)***

Odważono 10 g surowca, umieszczono w gilzie z bibuły filtracyjnej i poddano wyczerpującej ekstrakcji eterem naftowym w aparacie Soxhleta w czasie 15 godzin, a następnie wyczerpującej ekstrakcji metanolem (tę samą porcję surowca) również w czasie 15 godzin.

Uzyskane eterowe i metanolowe ekstrakty odparowano do sucha na wyparce próżniowej, a następnie rozpuszczono w metanolu i przeniesiono do kolbek miarowych o pojemności 100 ml i poddano analizie HPLC.

2.2.2. Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami w temperaturze pokojowej / w temperaturze 60°C. *(Ultrasound assisted extraction at room temperature / at 60°C)*

Odważono 5 g surowca, umieszczono w kolbie stożkowej ze szlifem, zalano 100 ml eteru naftowego i umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na 30 min; po tym czasie ekstrakt odsączono. Ekstrakcję powtórzono jeszcze dwa razy, zalewając surowiec takimi samymi, świeżymi porcjami eteru naftowego. Uzyskane eterowe i metanolewe ekstrakty przefiltrowano, odparowano do sucha na wyparce próżniowej, a następnie rozpuszczono w metanolu i przeniesiono do kolbek miarowych o pojemności 100 ml i poddano analizie HPLC.

2.2.3. Ekstrakcja wspomagana mikrofalami (mikrofałe otwarte) *(Microwave assisted extraction- open microwave)*

Odważono 2 g surowca, umieszczono w naczyniu ekstrakcyjnym i zalano 20 ml 80% metanolu w wodzie. Ekstrakcję prowadzono w trzech etapach w aparacie Plasmotronika, Uni Clever, BMZ – 1 (Wrocław) o mocy 600 W:

- etap pierwszy obejmował ekstrakcję przy 40% mocy generatora, pod ciśnieniem atmosferycznym, w ciągu 1 minuty,
- etap drugi obejmował ekstrakcję przy 60% mocy generatora, pod ciśnieniem atmosferycznym, w ciągu 30 minut,
- etap trzeci to 10 minut oczekiwania.

Ekstrakt przefiltrowano i uzupełniono metanolem w kolbce miarowej do objętości 50 ml i poddano analizie HPLC.

2.2.4. Ekstrakcja wspomagana mikrofalami (mikrofałe zamknięte) *(Microwave assisted extraction- closed microwave)*

Odważono 2 g surowca, umieszczono w naczyniu ekstrakcyjnym i zalano 20 ml 80% metanolu. Ekstrakcję prowadzono w trzech etapach:

- etap pierwszy obejmował ekstrakcję przy 40% mocy generatora, pod ciśnieniem 17–20 atm, w ciągu 1 minuty,
- etap drugi obejmował ekstrakcję przy 60% mocy generatora, pod ciśnieniem 27–30 atm, w ciągu 30 minut,
- etap trzeci to 10 minut oczekiwania.

Ekstrakt przefiltrowano i uzupełniono metanolem w kolbce miarowej do objętości 50 ml i poddano analizie HPLC.

2.2.5. Chromatografia analityczna *(Chromatographic analysis)*

Wysokosprawną chromatografię cieczową stosowano w celu kontroli składu izolowanych frakcji (analiza jakościowa) jak też w celu analizy ilo-

ściowej wybranych kumaryn w ekstraktach roślinnych. Stosowano odwrócone układy faz RP-18 / metanol + woda, w systemie gradientowym oraz metodę wzorca zewnętrznego [13].

Rodzienne chromatograficzne kumaryn przeprowadzono w temperaturze 25°C przy użyciu chromatografu Shimadzu LC-10 AT_{VP} HPLC z detektorem UV/VIS i dozownikiem próbki Rheodyne 20 µm, na kolumnie SuprelcosilTM LC-18 – 150 x 4.6mm, d_p = 5 µm. Zastosowano gradient fazy ruchomej (woda + metanol: 0-10 min – 45% MeOH, 10-20 min – 45-55% MeOH, 20-30 min – 55-70% MeOH, 30-40 min – 70% MeOH) oraz metodę wzorca zewnętrznego stosując wzorce substancji oznaczanych – umbeliferonu i imperatoryny i wyznaczając krzywe kalibracyjne. Identyfikacja i pomiar pików przebiegały przy długości fali λ = 254 nm. Oznaczanie jakościowe przeprowadzono chromatograficznie oraz poprzez porównanie widm UV z widmami wzorców. Widma dla poszczególnych kumaryn były uzyskiwane metodą „stop-flow” w trakcie trwania analizy.

Współczynniki regresji R² wszystkich krzywych kalibracyjnych wzorców były większe niż 0,999 (R² > 0,9990). Zakresy stężeń krzywych wzorcowych wynosiły: dla umbeliferonu 0,0001 mg/ml - 0,01 mg/ml, dla imperatoryny 0,01 mg/ml - 1 mg/ml.

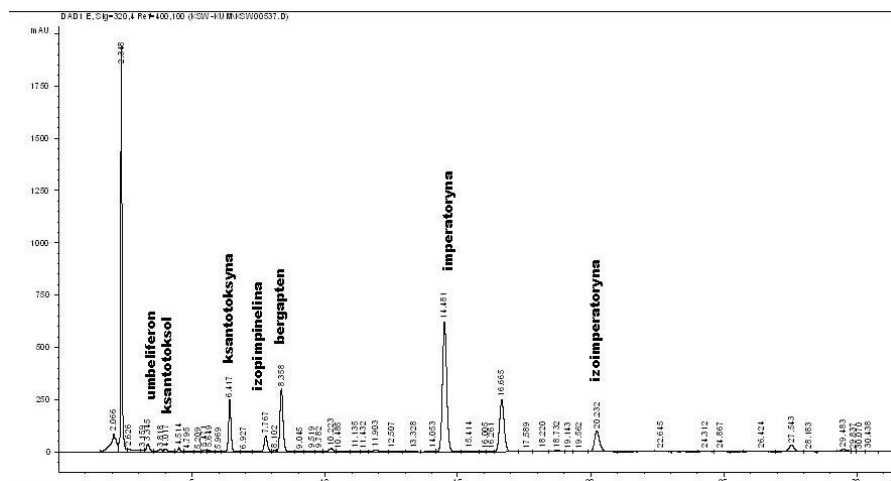
Dokładność zastosowanych metod ekstrakcyjnych była sprawdzona za pomocą odzysków badanych substancji. Do próbek przed analizą dodano znane ilości roztworów wzorcowych (3 stężenia), a następnie przeprowadzono takie same czynności jak przy ekstrakcji próbek nie fortyfikowanych roztworami wzorców. Wykonano 3 powtórzenia dla każdego stężenia wzorca. Odzyski dla zastosowanych metod ekstrakcyjnych były w granicach 95.34 - 102.00% i 92.67% - 95.65% odpowiednio dla umbeliferonu i imperatoryny.

3. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

Do izolacji furanokumaryn z owoców gorysza wyniosłego zastosowano następujące metody ekstrakcyjne: ekstrakcja w aparacie Soxhleta, ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami w temperaturze 20°C i 60°C oraz ekstrakcja wspomagana mikrofalami w układzie otwartym i zamkniętym. Wyniki, zebrane w tabeli 1 wskazują, iż dobre rezultaty daje ekstrakcja ultradźwiękowa w 60°C – metoda prosta i możliwa do zastosowania w wielu laboratoriach. Najwięcej imperatoryny wyizolowano właśnie przy zastosowaniu ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami w podwyższonej temperaturze (60°C), najmniej natomiast podczas ekstrakcji wyczerpującej w aparacie Soxhleta.

Z zastosowanych metod największy stopień odzysku umbeliferonu dawała ekstrakcja wspomagana mikrofalami w układzie zamkniętym, następnie USAE w 60°C, ekstrakcja w aparacie Soxhleta, USAE w 20°C i na końcu MASE w układzie otwartym.

Dla gorysza obserwujemy opisany już wcześniej przy pasternaku i arcydzięglu efekt działania mikrofal w układzie zamkniętym [10, 11]. W pierwszym etapie przeprowadzonego eksperymentu zastosowano dwie opcje ekstrakcji wspomaganej mikrofalami, a mianowicie MASE w układzie zamkniętym i w układzie otwartym. Wydajność ekstrakcji w układzie otwartym była dla imperatoryny wyższa niż w układzie zamkniętym. Możliwe jest, że podczas ekstrakcji mikrofalowej w układzie zamkniętym niektóre furanokumaryny (w przypadku ekstraktów uzyskanych arcydzięglu i pasternaku - prawdopodobnie imperatoryna lub felopteryna) podlegają rozkładowi lub izomeryzacji pod wpływem mikrofal i wysokiego ciśnienia [10, 11]. Przykładowy chromatogram kumaryn wyizolowanych z owoców gorysza przedstawia rysunek 1.



Rys. 1. Przykładowy chromatogram HPLC furanokumaryn wyizolowanych z owoców gorysza wyniosłego; metoda izolacji – ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami w podwyższonej temperaturze (60°C). Pik o czasie retencji $t_R = 16,56$ – niezidentyfikowany.

Fig. 1. Example of HPLC chromatogram of furanocoumarins isolated from *Peucedarium verticillare* fruits; isolation method – ultrasound assisted extraction at elevated temperature (60°C). Peak of $t_R = 16,56$ – unidentified. Applied gradient mobile phase (water + methanol: 0-10 min - 45% MeOH, 10-20 min - 45-55% MeOH, 20-30 min - 55-70% MeOH, 30-40 min - 70% MeOH and the internal standard method. Temp. 25°C, wavelength $\lambda = 254$.

Tabela 1. Zależność wydajności ekstrakcji (mg/g \pm SD) eterem naftowym i metanolem kumaryn z owoców gorysza wyniosłego od techniki ekstrakcyjnej

Table 1. Effect of the extraction type on cumarins isolation efficiency (mg/g \pm SD) from *Peucedanum verticillare* fruits using petroleum ether and methanol

Metoda ekstrakcji/lugowania (Extraction/leaching technique)	Extrahent (Extractant)	Umbeliferon (Umbeliferone) (mg/g)	Imperatoryna (Imperatorin) (mg/g)
Soxhlet	Eter naftowy (Petroleum ether)	-	1.790 \pm 0.009
	MeOH	1.231 \pm 0.123	-
	Suma (Total)	1.231	1.790
USAE 20°C	Eter naftowy (Petroleum ether)	-	1.890 \pm 0.246
	MeOH	1.189 \pm 0.123	0.161 \pm 0.005
	Suma (Total)	1.189	2.051
USAE 60°C	Eter naftowy (Petroleum ether)	-	6.678 \pm 0.136
	MeOH	1.793 \pm 0.056	-
	Suma (Total)	1.793	6.678
MASE o	80% MeOH	0.987 \pm 0.059	3.599 \pm 0.480
MASE p	80% MeOH	3.478 \pm 0.719	2.018 \pm 0.846

4. Wnioski (Conclusions)

Najsukuteczniejszą techniką izolacji imperatoryny z owoców gorysza wyniosłego była ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami w podwyższonej temperaturze (60°C), najmniej skuteczną – ekstrakcja w aparacie Soxhleta. Największy stopień odzysku umbeliferonu z gorysza daje ekstrakcja wspomagana mikrofalami w układzie zamkniętym, najniższy - MASE w układzie otwartym. W przypadku owoców gorysza, podobnie jak w przypadku opublikowanych już badań nad owocami arcydzięgla i pasternaku efekt działania mikrofal w układzie zamkniętym powoduje spadek zawartości imperatoryny w porównaniu z ekstrakcją w układzie otwartym. Ekstrakcja mikrofalowa z wysokim ciśnieniem nie jest, więc odpowiednią metodą ekstrakcji imperatoryny z owocu gorysza.

Literatura (References)

1. M.D. Luque de Castro, M.P. Da Silvia, *Strategies for solid sample treatment*, Trends in Analytical Chemistry, **16**(1997)16-24.
2. N. Saim, J.R. Dean, M.P. Abdullah, Z. Zakiria, *Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurized and atmospheric microwave – assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction*, J. Chromatogr. A, **791**(1997)361-366.
3. P.B. McClelland, P. Morgan, E.E. Leach, J. Shelk, *Psoralen photochemotherapy*, Dermatol. Nurs., **9**(1997)403-415.
4. W. Cisowski, *Biologiczne właściwości kumaryn. Cz. I. Działanie na rośliny oraz właściwości farmakologiczne i przeciwbakteryjne*, *The biological properties of coumarins. Part I. Effects on plants and pharmacological and antibacterial properties*, Herba Pol., **24**(1983)301-314.
5. F. Hadaček, C. Müller, A. Werner, H. Greger, P. Proksh, *Analysis, isolation and insectidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivatives from Peucedanum (Apiaceae: Apiodeae)*, Journal of Chemical Ecology, **20**(8)(1994)2035-2054.
6. S. Kohlmünzer, *Farmakognozja*, Pharmacognosy, PZWL, Warszawa 1993.
7. G. Zgórk, T. Dragan, K. Głowniak, E. Basiura, *Determination of furanochromones and pyranocoumarins in drugs and Ammi visnaga fruits by combined solid – phase extraction – high performance liquid chromatography and thin – layer chromatography – high performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, **797**(1998)305-309.
8. H.C. Huang, S.H. Chus, P.D. Chao, *Vasorelaxants from Chinese herbs, emodin and scoparone, possess immunosuppressive properties*, Eur. J. Pharmacol., **198**(1991)211-213.
9. M. Królikowska, *Analiza fitochemiczna roślinnych surowców leczniczych*, *Phytochemical analysis of medical plants*, AM, Łódź 1988.
10. M.E. Waksmundzka-Hajnos, A. Petruczynik, A. Dragan (Oniszczyk), D. Wianowska, A.L. Dawidowicz, I. Sowa, *Influence of the extraction mode on the yield of some furanocoumarins from Pastinaca sativa fruits*, J. Chromatogr. B, **800**(2004)181-187.
11. M.E. Waksmundzka-Hajnos, A. Petruczynik, A. Dragan, D. Wianowska, A.L. Dawidowicz, *Effect of extraction method on the yield of furanocoumarins from fruits of Archangelica officinalis Hoffm*, Phytochem. Anal., **15**(2004)313-319.
12. G. Romanik, E. Gilgenast, A. Przyjazny, M. Kamiński, *Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis*, Anal. Bioanal Chem., J. Biochem. Biophys. Methods, **70**(2007)253–261.

13. M. A. Hawrył, E. Soczewiński, T. H. Dzido, *Separation of coumarins from Archangelica officinalis in high-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography systems*, J. Chromatogr. A, **886**(2000)75-81.