

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Usprawniona metoda ekstrakcji amigdaliny z nasion pestek moreli

ANDRZEJ GÜNTHER¹, BARBARA BEDNARCZYK-CWYNAR², ANITA TURAŁA³

¹ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE, WYDZIAŁ TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ, INSTYTUT TECHNOLOGII CHEMICZNEJ ORGANICZNEJ

²UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY, KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII ORGANICZNEJ

³ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE, WYDZIAŁ TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ, KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ I CHEMII FIZYCZNEJ

Słowa kluczowe: amigdalina, izolowanie amigdaliny, ekstrakcja, nasiona pestek moreli

STRESZCZENIE:

Tradycyjna ekstrakcja w aparacie Soxhleta jest najczęstszą techniką używaną do izolowania związków naturalnych z materiałów biologicznych. Otrzymywanie amigdaliny również opiera się na ekstrakcji różnymi rozpuszczalnikami. W pracy przedstawiono wyniki badań usprawnionej ekstrakcji amigdaliny z zastosowaniem wody, 50% lub 96% alkoholu etylowego, a uzyskane wyniki porównano z ekstrakcją tradycyjną, w której stosuje się proste alkohole (w niniejszej pracy zastosowano bezwodny etanol).

Improved extraction method amygdalin from apricot seed kernels

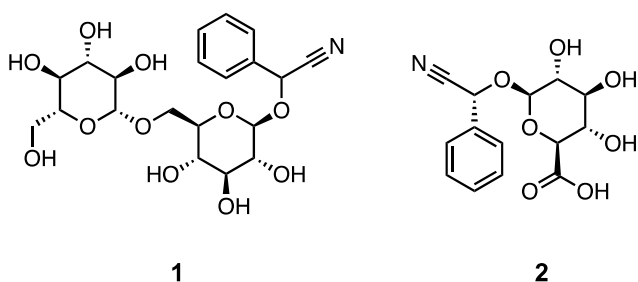
Keywords: amygdalin, isolation of amygdalin, extraxtion, apricot seed kernels,

ABSTRACT:

The traditional extraction in the Soxhlet apparatus is the most common technique used for isolation of natural compounds from biological materials. The obtaining of amygdalin is also based on extraction with different solvents. The paper presents the results of an improved extraction of amygdalin with water, 98% and 50% ethanol and compared with traditional method, with methanol, isopropanol or anhydrous ethanol applied as a solvent for extraction.

1. WSTĘP

Amigdalina (**1**) należy do grupy glikozydów naturalnych – związków szeroko rozpowszechnionych w świecie roślinnym. W skład tej cząsteczki wchodzi: dwie cząsteczki glukozy, połączone wiązaniem glikozydowym oraz aglikon (część nie cukrowa) połączona z cząsteczką glukozy wiązaniem eterowym. Amigdalina znana też jest pod innymi nazwami, takimi jak witamina B₁₇ oraz letril (**2**). Obie nazwy, choć często używane, są błędne, ponieważ pod nazwą „witamina B₁₇” kryje się nie amigdalina, a mieszanina tegoż związku z letrilem – związku o nieco innej budowie [1].



Rysunek 1 Wzór amigdaliny i letrilu
Figure 1 Structure of amygdalin and letrile

Amigdalina obecna jest w różnych stężeniach w wielu surowcach naturalnych, również tych spożywanych przez człowieka, np. w migdałach, stąd też wywodzi się jej łacińska nazwa *amygdalum*, oznaczającą właśnie migdał. Najbogatszym surowcem naturalnym są jądra pestek moreli, zawierające do 5,2% (w przeliczeniu na suchą masę), a także migdały i nasiona pestek wiśni, w których amigdalina zawarta jest w ilości 3-5%. W pestkach gruszek, jabłek czy śliwek stężenie nie przekracza zazwyczaj 0,4%. Śladowe ilości amigdaliny (**1**) obecne jest w pestkach owoców wielu innych roślin, np. jagód i czarnego bzu [2].

Od wielu lat amigdalina jest związkiem budzącym kontrowersje, przeciwnicy twierdzą, że obecny w cząsteczce cyjanowódor może doprowadzić do zatrucia. Zwolennicy natomiast uważają, że do uwolnienia cyjanowodoru dochodzi tylko za sprawą β -glukozydazy, enzymu obecnego w dużych stężeniach w komórkach nowotworowych. W komórkach zdrowych mitochondrialny enzym o nazwie rodanaza przekształca jony cyjankowe w mniej toksyczne rodanki [1, 3]. Badania wykazują, że amigdalina pod wpływem β -glukozydazy powoduje zatrzymanie wzrostu ludzkich komórek nowotworowych szyjki macicy (HeLa) [4], raka

prostaty (LNCaP i DU145) [5], oraz apoptozę ludzkich komórek nowotworowych wątroby (HepG2) [6]. Nie ma jeszcze wystarczającej ilości badań, które mogą jednoznacznie zaliczyć amigdalinę do substancji leczniczych czy nie [1].

2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

2.1 Materiały i odczynniki

Materiał biologiczny stanowiły wysuszone i zmielone jądra pestek moreli. Suszenie przeprowadzono przez dwa tygodnie i zachodziło w temperaturze 45°C. Jądra pestek moreli nabyto drogą handlową (kraj pochodzenia Izrael). Do ekstrakcji zastosowano odczynniki: eter dietylowy (Sigma Aldrich), alkohol etylowy (POCh), woda destylowana.

2.2 Wykonanie

Przygotowanie wstępne. Do badania użyto próbek materiału biologicznego o masie 10 g. Wszystkie próbki zalano eterem dietylowym, dokładnie wymieszano i odstawiono na 24 godziny, w celu pozbycia się oleju utrudniającego ekstrakcję amigdaliny. Po upływie powyższego czasu eter dietylowy odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, a wysuszony materiał biologiczny poddano właściwiej ekstrakcji. Proces usuwania oleju można przyspieszyć, przeprowadzając ekstrakcję wstępną (przez 2 – 4 godziny) w aparacie Soxhleta.

Dobór rozpuszczalnika i temperatury w celu oszacowania optymalnego czasu ekstrakcji. Po wstępnej ekstrakcji i oddzieleniu rozpuszczalnika materiał biologiczny wysuszono i umieszczono w kolbach okrągłodennych zaopatrzonych w łożnie wodne i mieszadła magnetyczne z funkcją grzania. Do każdej z kolb wlewo odpowiednio po 100 cm³: wody destylowanej, etanolu 50%, etanolu 96%. Ekstrakcję przeprowadzono w temperaturze 50°C dla każdego z trzech wymienionych rozpuszczalników, a w drugiej serii w temperaturach wrzenia zastosowanych rozpuszczalników (woda: 100°C, etanol 50%: 92°C, etanol 96%: 78°C). Każdą z powyższych ekstrakcji prowadzono w każdym z wymienionych przedziałów czasowych: 50, 100, 150 i 200 minut.

Po zakończeniu ekstrakcji roztwory przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem, z przesączu oddestylowano do sucha rozpuszczalniki, stosując wyparkę obrotową. Do uzyskanego osadu dodano

niewielką ilość eteru dietylowego i całość wymieszano. Następnie rozpuszczalnik odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Surową amigdalinę po wysuszeniu krystalizowano z 96% etanolu.

Przeprowadzenie standardowej ekstrakcji w celu porównawczym. Istnieje wiele różnych metod ekstrakcji amigdaliny, wybrano najpopularniejszą wykorzystującą etanol. Postępując w oparciu o jedną z nich [7], odważono 10 g surowca i nie poddając go wcześniejszej ekstrakcji eterem, umieszczono w aparacie Soxhleta. Surowiec ekstrahowano etanolem 96% w temperaturze wrzenia przez godzinę. Po zakończeniu ekstrakcji uzyskany ekstrakt zateżono do około ¼ objętości i odstawiono na 24 godziny do krystalizacji. Następnie dodano tyle eteru dietylowego, aby po wymieszaniu olej się rozpuścił. Amigdalinę odsączono i rekrystalizowano z 96% etanolu.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

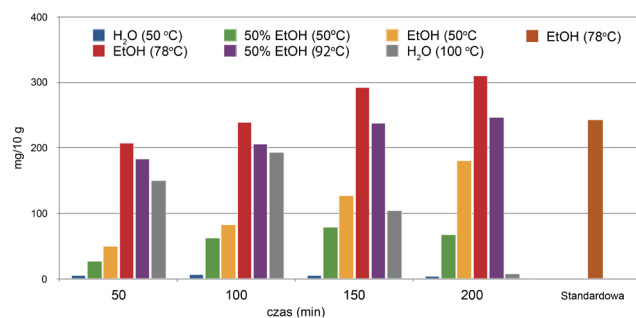
Otrzymaną amigdalinę zidentyfikowano w oparciu o analizę danych spektralnych (NMR, IR) i temperaturę topnienia (225°C). Powyższe dane pozostawały w zgodności z odpowiednimi danymi dostępnymi w piśmiennictwie [8-10].

Z przeprowadzonych doświadczeń jasno wynika, że duży wpływ na wydajność ma temperatura ekstrakcji oraz czas. Amigdalina jest bardzo dobrze rozpuszczalna w wodzie oraz etanolu i dobrze w butanolu, nierozpuszczalna natomiast w eterze dietylowym. Z tego powodu zdecydowano się użyć dwa pierwsze rozpuszczalniki do ekstrakcji.

Ekstrakcję z trzykrotnym powtórzeniem przeprowadzono łącznie 72 razy, każdorazowo stosując wodę, etanol 50% lub etanol 96% oraz metodę opracowaną przez Autorów. Przeprowadzono

także ekstrakcję standardową (z trzykrotnym powtórzeniem), której uśredniony wynik był punktem odniesienia. Wyniki przedstawiono w Tabeli 1.

Ekstrakcja przy użyciu wody w temperaturze 50°C dawała najmniej satysfakcjonujące wyniki. Przy dłuższym ogrzewaniu zaobserwowano obniżenie wydajności (Rys. 2), co świadczyć może o hydrolizie amigdaliny.



Rysunek 2 Uśredniona wydajności przeprowadzonych ekstrakcji (mg/10 g)

Figure 2 Average yields of the performed extractions (mg/10 g)

Odniesienie do ekstrakcji prowadzonej w etanolu, przez 60 min, w temperaturze 92°C. Uśredniona wydajność 217 mg.

Zastosowanie rozcieńczonego (50%) etanolu, ogrzewanego jedynie do 50°C, powoduje od 4,5- do 16-krotnego wzrostu ilości wyekstrahowanej amigdaliny, w stosunku do ekstrakcji ciepłą wodą w tym samym przedziale czasowym. Najwięcej tego związku uzyskano (80,19 mg), przeprowadzając ekstrakcję przez 150 minut. Zastosowanie 96% etanolu i tej samej temperatury ekstrakcji skutkuje dalszym wzrostem ilości wyizolowanej amigdaliny, od ok. 50 mg (czas ekstrakcji: 50 min) do ok. 182 mg (czas ekstrakcji: 200 min).

Tabela 1 Uśrednione wyniki serii ekstrakcji z 10 g materiału biologicznego
Table 1 Average results from series of 24 extraction with 10 g of biological material

Temperatura [°C]	Rozpuszczalnik	Ilość amigdaliny [mg] wyizolowanej w wyniku ekstrakcji w danych warunkach			
		Czas ekstrakcji			
		50 min	100 min	150 min	200 min
50	woda	6,12	6,80	6,11	4,13
50	50% etanol	27,74	62,51	80,19	68,23
50	96% etanol	50,53	83,29	128,13	182,02
100	woda	149,43	193,10	103,57	8,14
92	50% etanol	184,14	207,05	237,46	247,28
97,5	96% etanol	207,13	239,58	292,72	310,82

Dalszy, bardzo wyraźny wzrost ilości amigdaliny wyizolowanej z 10 g surowca naturalnego zaobserwowano, stosując do ekstrakcji wrzący rozpuszczalnik. Wyjątek stanowiła wrząca woda, której dłuższe stosowanie prowadziło do spadku wydajności (150 i 200 min), spowodowany częściową hydrolizą amigdaliny. Podobnie jest z użyciem ciepłej wody (150 i 200 min), zamiast wzrostu, obserwowano spadek ilości wyizolowanej amigdaliny. Wzrost wydajności ekstrakcji w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, za wyjątkiem ekstrakcji wodą, jest szczególnie wyraźny po przeprowadzeniu dwupółgodzinnego procesu, podczas którego rozcieńczonym etanolem wyekstrahowano ok. 238 mg amigdaliny, zaś 96% – ok. 293 mg. Dalsze wydłużenie czasu ekstrakcji tylko nieznacznie wpływało na wzrost wydajności (odpowiednio: 246 i 310 mg).

W wyniku standardowej metody ekstrakcji, tj. trwającej 60 minut i odbywającej się w temperaturze 92°C uzyskano średnio 217 mg amigdaliny. Rezultat ten można porównać do 100-minutowej ekstrakcji rozcieńczonym etanolem, bądź 50-minutowej ekstrakcji etanolem stężonym (96%).

Prostego usprawnienia dokonano na dwóch etapach procesu izolowania amigdaliny z jąder pestek moreli. Pierwszy z nich polegał na zastosowaniu eteru dietylowego, mające na celu pozbycie się sporych ilości oleju utrudniającego ekstrakcję. Eter zastosowano jeszcze przed przeprowadzeniem ekstrakcji właściwej, co przyczyniło się do wyizolowania amigdaliny o wysokim stopniu czystości. Drugi z tych etapów, to zastosowanie 50%, zamiast 96% etanolu, połączonego z wydłużeniem czasu ekstrakcji do 100 min. Wiąże się z to z oszczędnościami rozpuszczalnika, którego wystarczy użyć jedynie połowy, w porównaniu z metodą klasyczną. W celu dalszego zwiększenia wydajności ekstrakcji, proces ten może być wydłużony o dalsze 50 minut.

Amigdalina jest związkiem chemicznym, z którym wiąże się duże nadzieje, a jej szeroka dostępność z surowców roślinnych stanowi dodatkowy bodziec do poszukiwania usprawnionych metod jej izolowania. Usprawnienia te mogą być bardzo proste, a jednocześnie skuteczne, co wykazano w niniejszej publikacji.

LITERATURA

- [1] Günther A., Amigdalina - jako wstęp do świata związków naturalnych, *Chemia w Szkole*, 4 (2016), 48-50.
- [2] Cairns T., Froberg J. E., Gonzales S., Langham W. S., Stamp J. J., Howie J. K., Sawyer D. T., Analytical Chemistry of Amygdalin, *Anal. Chem.*, 50 (1978), 317-322.
- [3] Günther A., Bednarczyk-Cwynar B., Amigdalina – łatwo dostępny związek o ciekawych właściwościach farmakologicznych, I Wielkopolskie Seminarium Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów BioOrg 2015, Poznań, grudzień, 2015, 190-192.
- [4] Chen Y., Ma J., Wang F., Hu J., Cui A., Wei C., Yang Q., Li F., Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa cells, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 35 (2013), 43-51.
- [5] Chang H. K., Shin M. S., Yang H. Y., Lee J. W., Kim Y. S., Lee M. H., Kim J., Kim K. H., Kim C. J., Amygdalin Induces Apoptosis through Regulation of Bax and Bcl-2 Expressions in Human DU245 and LNCaP Prostate Cancer Cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 29 (2006), 1597-1602.
- [6] Zhou C., Qian L., Ma H., Yu X., Zhang Y., Qu W., Zhang X., Xia W, Enhancement of amygdalin activated with beta-d-glucosidase on HepG2 cells proliferation and apoptosis, *Carbohydr Polym.*, 90 (2012) 516-523.
- [7] Ghiulai V. M., Socaciu C., Jianu I., Ranga F., Fetea F., *Bul. USAMV*, 62 (2006), 246-253.
- [8] Savic I. M., Nikolic V. D., Savic-Gajic I. M., Nikolic L. B., Ibrić S. R., Gajic D. G., Optimization of technological procedure for amygdalin isolation from plum seeds (*Pruni domesticae* semen), *Front. Plant Sci.*, 6 (2015) article 276.
- [9] Yashunsky D. V., Kulakovskaya E. V., Kulakovskaya T. V., Zhukova O. S., Kiselevskiy M. V., Nifantiev N. E., *J. Carbohydr. Chem.*, 34 (2015) 460-474.
- [10] Ribeiro A. A., ¹H and ¹³C NMR Analysis of D-Amygdalin: Oligosaccharide Assignment and Sequencing, *Magn. Res.Chem.*, 28 (1990) 765-773.