

Izolacija solanesola iz duhana (*Nicotiana tabacum* L.) klasičnom ekstrakcijom i ultrazvučnom ekstrakcijom

Keča, Mirko; Gross, Srećko; Malnar, Ivica; Kalođera, Zdenka; Malojčić, Rajko

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 1997, 53, 173 - 182**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:328446>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



FARMACEUTSKI GLASNIK

GLASILO HRVATSKOG FARMACEUTSKOG DRUŠTVA

GOD. 53

LIPANJ 1997.

BROJ 6

FAGLAI

Farm.Glas.

ISSN 014-8202

STRUČNI RADOVI

¹Mirko Keča (Zagreb), ²Srećko Gross (Zagreb), ³Ivica Malnar (Zagreb),
³Zdenka Kalodera (Zagreb), i ²Rajko Malojčić (Zagreb)

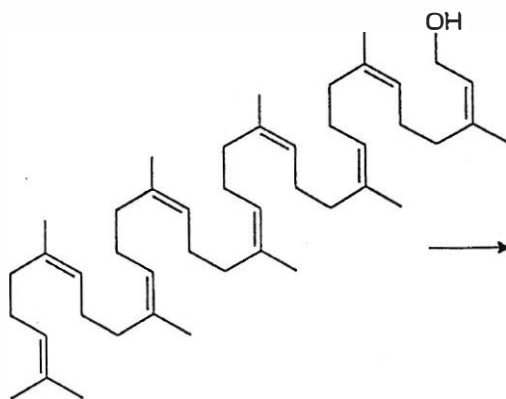
Izolacija solanesola iz duhana (*Nicotiana tabacum* L.) klasičnom ekstrakcijom i ultrazvučnom ekstrakcijom

(Primljeno 17. III. 1997.)

UVOD

Kemijska svojstva solanesola

Solanesol je aciklički triseskviterpen, izoprenoidni nezasićeni primarni alkohol sastavljen od devet izoprenskih jedinica. Bruto formula solanesola je $C_{45}H_{74}O$, a relativna molekulska masa 631. Prema IUPAC-nomenklaturi kemijski mu je naziv 3,7,11,15,19,23,27,31,35-nonametil-2,6,10,14,18,22,26,30,34- heksatriakontanonaen-1-ol (1).



Solanesol

(¹ARBIT, Zagreb, ²Pliva, Istraživački institut, Zagreb, ³Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb)

Istraživanja su dala različite podatke o stereokemijskoj strukturi solanesola. Ima primjera gdje se navodi da su sve dvostruke veze transkonfiguracije ili da su sve dvostruke veze cis-konfiguracije, ili također da su djelomično cis-, a djelomično trans-konfiguracije (2).

Solanesol je prvi put izoliran iz listova duhana, *Nicotiana tabacum* L., 1956. godine (3). Narashimba i Chakreborty (4) izolirali su 1979. solanesol iz duhanskog otpada. Duhanski otpad nastaje kod rezanja listova duhana u duhanskoj proizvodnji. To je ustvari prašina duhanskog lista veličine čestica od 0,2 do 1 mm i ne može se upotrijebiti za proizvodnju cigareta. Solanesol je bijeli amorfni prašak tališta 41,5–42,5 °C. U vodi je gotovo netopljiv, a lako se otapa u organskim otapalima (metanolu, heksanu, petroleteru, acetonu). Pokazuje neselektivnu apsorpciju u UV spektru i optički je inaktivan (2).

Solanesol je karakterističan sastojak za porodicu Solanaceae, a daleko najviše sadržava ga rod *Nicotiana*. Količina solanesola u duhanu kreće se od 0,3 do 3% mase suhog lista duhana (5,6,7,8). Najučestaliji je terpenoid u duhanu i glavna je komponenta lipidne frakcije duhana. Solanesol u listovima duhana dolazi slobodan i vezan na više masne kiseline. Od estera najviše su zastupljeni esteri palmitinske, linolne, linolenske, miristinske i oleinske kiseline (9,10).

Solanesol, zajedno s drugim terpenima, pridonosi aromi osušenog lista duhana. Pirolitičkom razgradnjom na temperaturi do 550 °C stvaraju se izoprenske jedinice, te monoterpeneidi, uglavnom dipenteni (limonen) (3).

Solanesol je najpouzdaniji detektor zagađenosti prostorija duhanskim dimom. To je posljedica niske hlapljivosti solanesola, kao i njegove relativno visoke koncentracije u duhanskom dimu (11).

Djelovanje solanesola

Esterifikacijom solanesola s derivatima benzoil-klorida pripremljeni su derivati s hipolipemičkim djelovanjem. Npr. solanesil-p-nitrobenzoat pokazao se jednako uspješnim kao i klobifat u sniženju serumskog kolesterola. Slično djeluju i solanesil-3,5-dinitrobenzoat te solanesil-4-aminobenzoat.

Derivati solanesola, N-solanesil-N,N-bis(3,4-dimetoksibenzil)-etilendiamin u kombinaciji s citostaticima kao što su aktinomycin D, vinkristin, 5-fluoruracil, pokazuju sinergistički učinak. Ispitivanja su pokazala da je za to djelovanje odgovorna sterička konformacija N-solanesil-N,N-bis(3,4-dimetoksibenzil)-etilendiamina. Međutim, niti solanesol niti diaminska komponenta nemaju citostatičku aktivnost (12).

Spominje se i moguća uporaba solanesola u pripremi droga djelotvornih na kardiovaskularni sustav, kao i antiulkusni učinak određenih derivata solanesola.

Dokazano je i virustatsko djelovanje solanesilamina koji je priređen Gabrijelovom sintezom (4).

EKSPERIMENTALNI DIO

Materijal i metode

Biljni materijal

Za izolaciju solanesola služila je prašina usitnjenih dijelova lista duhana, *Nicotiana tabacum* L., Solanaceae. Duhanska je prašina dobivena kao otpad pri proizvodnji cigareta u Tvornici duhana Zagreb. Veličina čestica duhanske prašine bila je 0,2–1 mm.

Aparati

Elektromotorna mješalica s mogućnošću reguliranja broja okretaja RW 28 DX, Janke & Kunkel, Staufen, Njemačka.

Sušionik električni HERAEUS, Hanau, Njemačka.

Aparatura za ultrazvučnu ekstrakciju s uronjenom sonotrodnom: ultrazvučni generator UZ-250, Tehnoprocessing, Zagreb.

HPLC uređaj Hewled Packard, Palo Ato, USA

– pumpa L; 6200A Hitachi Merck,

– detektor – DAD L -4500 Hitachi Merck, 220 um,

– kolona – Li Chro Cart^R 125-4 C₁₈ (5 um),

– standard: 90% solanesol (SIGMA),

– otapalo: metanol (Merck Li Crosolv^R);

– smjesa otapala za eluiranje metanol:acetonitril (Merck Li Crosolv^R), 70:30; 1,5 mL/min.

Metode izolacije

– klasična ekstrakcija

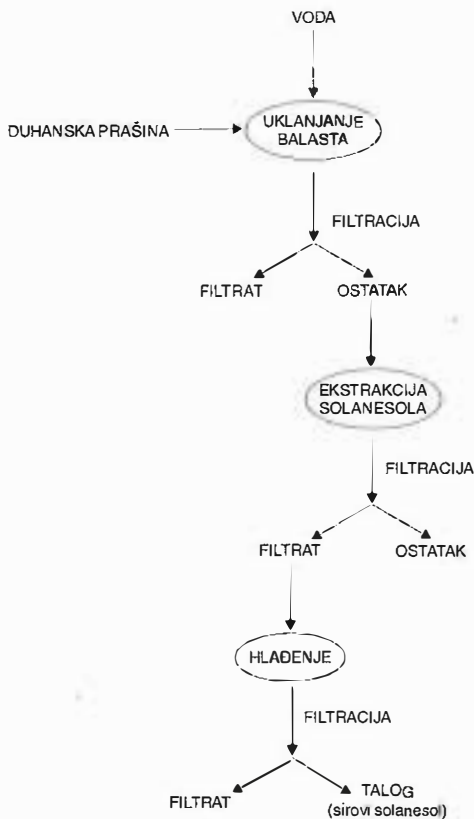
– ekstrakcija ultrazvukom (frekvencija 40 kHz, vrijeme trajanja 60 min, snaga 250 W, jačina struje 0,850 A, napon 238 V).

Izolacija solanesola klasičnom ekstrakcijom

U tikvicu za miješanje stavljeno je 596 g (2 L volumne zapremine) duhanske prašine i preliveno sa 6 litara demineralizirane vode. Elektromotornom mješalicom smjesa je miješana 3 sata na sobnoj temperaturi. Nakon miješanja smjesa je filtrirana aparaturom za filtriranje pod sniženim tlakom. Vlažna duhanska prašina (talog) vraćena je u tikvicu za miješanje i postupak obrade s vodom ponovljen na isti način još dvaput. Nakon zadnje filtracije vlažna duhanska prašina raširena je na posudi za sušenje i sušena u sušioniku na 45 °C. Dobiveno je 271 g suhe duhanske prašine.

Na 50 g suhe duhanske prašine dobivene nakon ispiranja vodom dodano je 800 mL metanola. Miješano je elektromotornom mješalicom na sobnoj temperaturi 8 sati. Nakon miješanja gornji, metanolni sloj je oddekaniran, a ostatku je dodano 400 mL metanola te ponovo miješano 8 sati. Ekstrakcija sa 400 mL metanola ponovljena je još jedanput, a na kraju je smjesa filtri-

rana preko pamučne tkanine na aparaturi za filtraciju pod sniženim tlakom. Sjedinjeni metanolni ekstrakti (1450 mL) profiltrirani su preko filter papira, te ostavljeni u staklenoj posudi preko noći na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nastali zelenkastosmeđi talog filtriran je preko filter papira (shema 1).



Shema 1. Izolacija solanesola iz duhanske prašine

Talog je sirovi, nepročišćeni solanesol. Na sobnoj temperaturi talog prima izgled tamnosmeđe žitke mase. Izolacija solanesola klasičnom ekstrakcijom provedena je triput (klasična ekstrakcija 1, 2, 3).

Izolacija solanesola postupkom ekstrakcije ultrazvukom

U tikvicu za miješanje stavljeno je 596 g suhe duhanske prašine preliveno sa 6 L demineralizirane vode. Smjesa je zatim miješana ultrazvučnim aparatom 1 sat. Smjesa je zatim filtrirana aparaturom za filtriranje pod sniženim tlakom. Duhanska prašina vraćena je u tikvicu za miješanje i ponovo

promiješana u istoj količini vode i pod istim uvjetima još dvaput. Nakon zadnje filtracije vlažna duhanska prašina sušena je u sušioniku pri 45 °C.

50 g vodom isprane i osušene duhanske prašine preliveno je sa 800 mL metanola. U smjesu je uronjena sonotroda ultrazvučnog pretvarača i provedena je ultrazvučna ekstrakcija uz istovremeno miješanje smjese magnetском mješalicom i hlađenje ledom. Nakon ekstrakcije oddekantiran je gornji metanolni sloj, a ostatku je dodano 400 mL metanola i ekstrakcija je ponovljena. Ekstrakcija sa 400 mL metanola ponovljena je još jedanput, te je na kraju smjesa filtrirana kroz pamučnu tkaninu za filtriranje pod sniženim tlakom. Sjedinjeni metanolni ekstrakti (1400 mL) filtrirani su preko filter papira i ostavljeni preko noći u hladnjaku na -18 °C. Nastali zelenkastosmeđi talog filtriran je preko filter papira. Dobiveni je talog sirovi solanesol.

Izolacija solanesola postupkom ekstrakcije ultrazvukom ponovljena je triput (ultrazvučna ekstrakcija 1, 2 i 3).

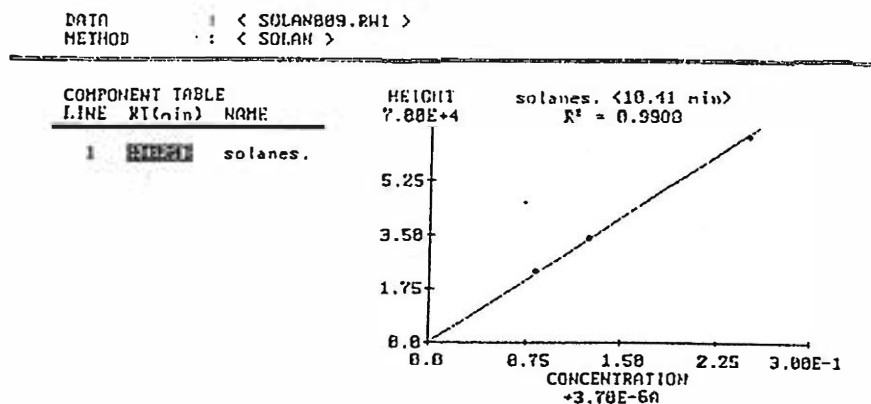
Određivanje solanesola tekućinskom kromatografijom visokog učinka

U talozima dobivenim klasičnom ekstrakcijom i ekstrakcijom ultrazvukom određivana je količina solanesola tekućinskom kromatografijom visokog učinka.

Priprema otopine uzorka; 0,1 g uzorka otopi se u 10 mL metanola, otpipetira 0,1 mL ove otopine i doda 0,3 mL metanola.

Priprema otopine standarda: 2 mg solanesola otopi se u 2 mL metanola. Po 1 mL ove otopine otpipetira se u tri bočice. U prvu se doda 1,1 mL, u drugu 0,7 mL i u treću 0,3 mL metanola. Tako se dobiju otopine solanesola u koncentracijama 0,0083% (standard 1), 0,0125% (standard 2) i 0,025% (standard 3).

Za injektiranje uzima se po 20 µL otopine standarda i uzorka. Sa standardnim otopinama solanesola načinjen je baždarni pravac kojim su određene koncentracije solanesola u uzorcima (slika 1)



Slika 1. Baždarni pravac

REZULTATI I RASPRAVA

Izolacija solanesola klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom provedena je triput (klasična ekstrakcija 1, 2 i 3 i ultrazvučna ekstrakcija 1, 2 i 3). Za obje uzimano je po 50 g duhanske prašine, obrađene vodom da bi se uklonilo balastne tvari. Obradom vodom uklonjene su polarne sastavnice, prije svega nikotin, jabučna, limunska i oksalna kiselina, te druge organske kiseline. Ispiranjem vodom uklanja se čak 50% sastavnica lista duhana, prepolovljuju se težina i volumen duhana (sa 596 g na 271 g) i tako smanjuje potrebna količina metanola za ekstrakciju. Vodeni dio sadržava oko 90% od ukupne količine duhana ostalog u duhanskom otpadu. Ispiranjem vodom gube se zanemarive količine solanesola.

Budući da se ispiranjem vodom težina duhanske prašine smanjuje na oko polovicu, u našem slučaju 55% (sa 596 g na 271 g), to znači da uzorak od 50 g duhanske prašine isprane vodom odgovara količini od 110 g suhe duhanske prašine uzete za postupak izolacije, odnosno ekstrakcije.

Izolacija solanesola objema metodama, klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom, obavljena je pomoću metanola kao ekstrakcijskog sredstva. Metanol je idealno otapalo za ekstrakciju solanesola iz duhana. Ostale lipidne sastavnice duhana (estri masnih kiselina, steroidi, steroidni esteri) umjerenost su topljivi u metanolu te se tako ekstrakt oslobađa balastnih tvari koje su inače prisutne u heksanskim ekstraktima. Metanolni ekstrakt sadržava veliki broj drugih sastavnica, posebice slobodnih i smolastih kiselina te drugih smola. Kod prekrizalizacije ovi spojevi ostaju otopljeni u metanolu pri nižim temperaturama, dok se solanesol istaloži pri tim temperaturama.

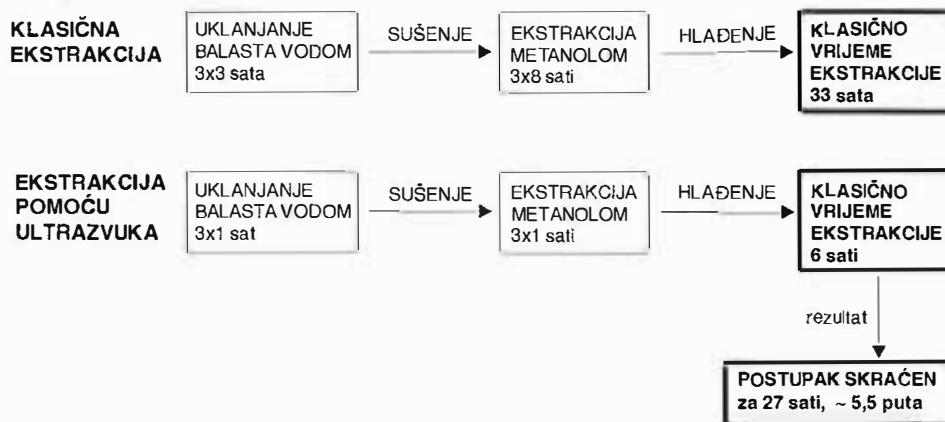
Izolacija solanesola klasičnom ekstrakcijom je dugotrajna, jer uključuje miješanja elektromotornom mješalicom i to u dijelu ispiranja vodom 3 puta po 3 sata, a u ekstrakciji metanolom 3 puta po 8 sati, ukupno 33 sata.

Ultrazvučnom ekstrakcijom dobivaju se brzo visokovrijedne iscrpine biljnog materijala. Ultrazvučna ekstrakcija provodi se tako da se određenom volumenu uzorka doda 1 volumen do 20 volumena otapala za ekstrakciju te se smjesa podvrgne djelovanju ultrazvuka određeno vrijeme. Pod utjecajem ultrazvučnih valova pucaju celulozne stjenke stanica lista duhana i ubrzava se ekstrakcija solanesola iz biljnog materijala.

Ultrazvučna ekstrakcija solanesola traje u prvoj fazi 3 puta po 1 sat i zatim 3 puta po 1 sat tijekom ekstrakcije metanolom, ukupno 6 sati. Ultrazvučna ekstrakcija brža je od klasične ekstrakcije za 27 sati (shema 2). Nakon ultrazvučne ekstrakcije nastavlja se klasična izolacija.

Količine dobivenog taloga sa solanesolom bile su podjednake nakon obje ekstrakcije (tablica 1). Količina solanesola u talogu određivana je tekućinskom kromatografijom visokog učinka (slika 2, 3 i 4).

Količine solanesola u talozima pomoću baždarnog pravca dobivene su kompjutorskom obradom uz pretpostavku da je standardni preparat čist.



Shema 2. Usporedba duljine trajanja izolacije solanesola klasičnom ekstrakcijom i ekstrakcijom pomoću ultrazvuka

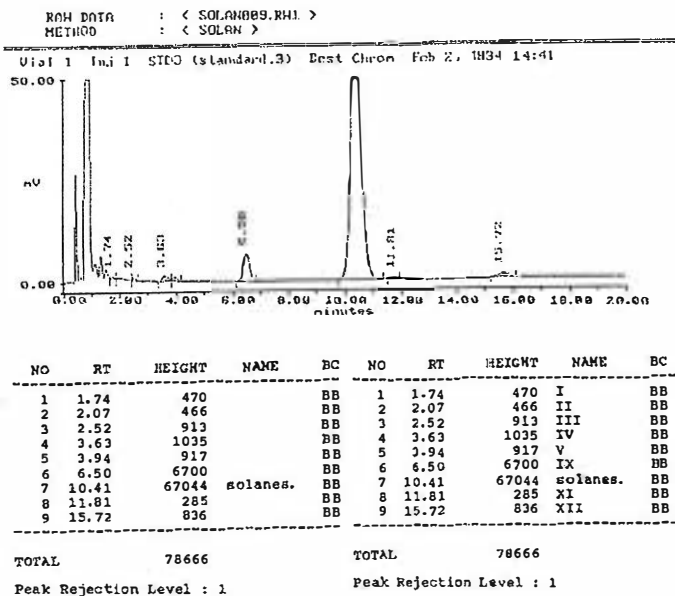
METODA IZOLACIJE	KOLIČINA DUHANSKE PRAŠINE (g)	TALOG SA SOLANESOLOM (g)	KOLIČINA SOLANESOLA U TALOGU (%)	KOLIČINA SOLANESOLA U DUHANSKOJ PRAŠINI (g)
Klasična ekstrakcija 1	110	1,5472	31,073	0,4808
Klasična ekstrakcija 2	110	1,1087	28,283	0,3131
Klasična ekstrakcija 3	110	1,3201	26,625	0,3515
		X = 1,3253	X = 28,660	X = 0,3818
Ultrazvučna ekstrakcija 1	110	1,5294	32,665	0,4996
Ultrazvučna ekstrakcija 2	110	0,9470	24,293	0,2301
Ultrazvučna ekstrakcija 3	110	0,9604	26,747	0,2569
		X = 1,1456	X = 27,902	X = 0,3289

Tablica 1. Količina solanesola u duhanskoj prašini (g) dobivena klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom

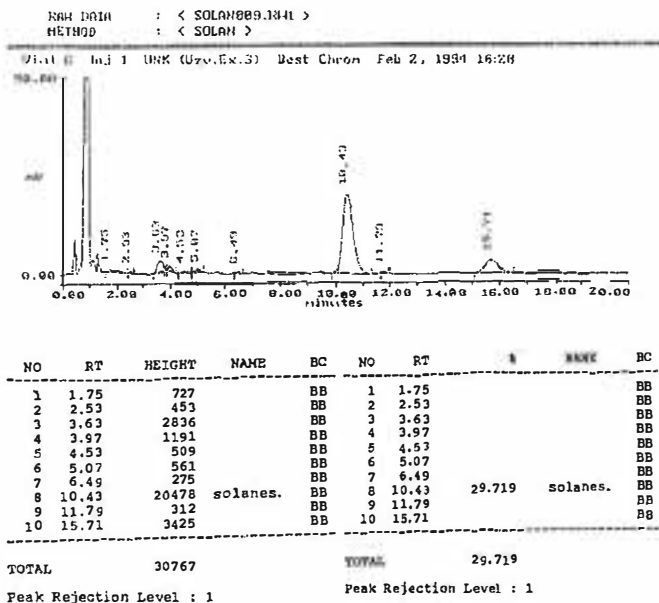
Budući da je standardni preparat devedesetpostotan, ispravljeni su rezultati za količinu solanesola u talogu.

Količina solanesola u uzorcima dobivena tekućinskom kromatografijom visokog učinka prikazana je u tablici 1. Tablica prikazuje i količinu solanesola preračunanu na duhansku prašinu, kao biljnog materijala kojim je izoliran solanesol klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom. Podjednaka je količina solanesola dobivena iz duhanske prašine klasičnom i ultrazvučnom ekstrakcijom: 0,3818 g odnosno 0,3289 g, što je 10% manje postupkom uz primjenu ultrazvuka.

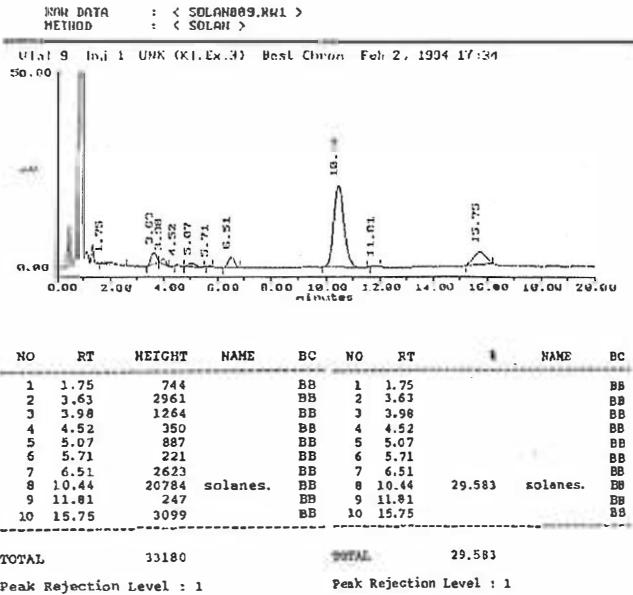
Budući da je ultrazvučna ekstrakcija brža za 27 sati, a iskorištenje se smanjuje za samo 10%, to su vrlo značajne prednosti u odnosu na ekstrakciju



Slika 2. HPLC kromatogram otopine standarda



Slika 3. HPLC kromatogram sirovog solanesola dobivenog postupkom klasične ekstrakcije



Slika 4. HPLC kromatogram sirovog solanesola dobivenog postupkom ekstrakcije pomoću ultrazvuka

biljnog materijala. Povećanje učinkovitosti metode ultrazvučne ekstrakcije, u ovom primjeru ekstrakcije solanesola iz duhanske prašine, rezultira izravno smanjivanjem troškova procesa.

Zahvaljujemo se pok. prof. dr. S. Borčiću na ideji i predloženoj temi za ovaj rad.

(¹ARBIT, Zagreb, ²Pliva, Istraživački institut, Zagreb, ³Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb)

**Isolation of solanesol from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)
 by the procedure of classical extraction and
 extraction by ultrasound**

by M. Keča¹, S. Gross², Z. Kalodžera³, I. Malnar³ and R. Malojčić³

S u m m a r y

Solanesol (C₄₅H₇₄OH) is natural acyclic trisesquiterpenoid alcohol. It was first isolated from tobacco, *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) in 1956 (3). Since then solanesol, as well as some of its derivatives, have been studied by various scientists. The studies concentrated on isolation procedures, analysis, synthesis and the use of solanesol and its derivatives.

Isolation of solanesol is carried out using the procedure of classical extraction by methanol. We have isolated solanesol from tobacco dust using the procedure of classical extraction and the extraction by ultrasound. The extraction procedure was shortened with the use of ultrasound for the period of 27 hours, which points out the great advantages of ultrasound in extraction of plant material, in this case extraction of solanesol from tobacco dust. The amount of solanesol obtained after the extraction procedure was established by fluid chromatography with high efficiency. The amounts of solanesol obtained by classical extraction and extraction by ultrasound were the same.

¹ARBIT, Zagreb, ²Research Institute PLIVA, Zagreb and ³Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb, Zagreb, Croatia)

Literatura – References

- (1) K. Sato, S. Inoue, A. Onishi, N. Uchida, and N. Minowa, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **13** (1981) 761
- (2) J. D. Grossman, R. M. Ikeda, E. J. Deszyck, and A. Bawley, *Nature* **199** (1963) 61.
- (3) R. L. Rowland, P. H. Latimer, and J. A. Giles, *J. Am. Chem. Soc.* **78** (1956) 4680.
- (4) C. V. Narashimha Rao and M. K. Chakreborty *Res. Ind.* **24** (1979) 83.
- (5) R. F. Severson, J. J. Ellington, R. F. Arrendale, and E. M. Snook, *J. Chromatogr.* **160** (1) (1978) 155.
- (6) R. F. Severson, J. J. Ellington, P. F. Schlotzhauer, R. F. Arrendale, and A. I. Schepartz, *J. Chromatogr.* **139** (1977) 269.
- (7) S. J. Sheen, D. L. Davis, D. W. DeJong, and J. F. Chaplin, *J. Agric. Food Chem.* **26** (1) (1978) 259.
- (8) A. W. Court and J. G. Hendel, *Tob. Sci.* **31** (1987) 79.
- (9) A. R. Wellburn and F. W. Hemming, *J. Chromatogr.* **23** (1) (1966) 51.
- (10) W. J. Chamberlain, R. F. Severson, and O. T. Chortyk, *J. Chromatogr.* **513** (1990) 55.
- (11) M. W. Ogden and K. C. Maiolo, *Environ. Sci. Technol.* **23** (9) (1989) 1148.
- (12) H. Suzuki, A. Tbmida, and T. Nishimura, *Jpn. J. Cancer Res. Gann*, **81** (3) (1990) 298.