

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

OTRZYMANIE WYCIĄGU BENZYNOWEGO I OLEJU

Owoce kopru ogrodowego (1000 g), pochodzące ze sklepów Centrali Nasiennej, po sprawdzeniu tożsamości sproszkowano i ekstrahowano benzyną w aparacie ekstrakcyjnym firmy Quickfit o kołowym obiegu rozpuszczalnika. Z uzyskanego wyciągu benzynowego odpędzono całkowicie rozpuszczalnik, w wyniku czego uzyskano olej (98 g) w ilości stanowiącej ok. 10% użytego do badań surowca.

Część uzyskanego oleju (18 g) przeznaczono do badań fizykochemicznych, oznaczając ogólnie przyjętymi metodami (3) takie właściwości fizykochemiczne jak: gęstość ($d_{20}^20=0,8980$ g/cm³), współczynnik załamania światła ($n_D^{20}=1,477$, mierzony w refraktometrze Abbego), liczbę zmydlania (LZ=112,2), liczbę kwasową (LK=3,6), liczbę estrową (LE=108,6), liczbę jodową (LJ=82,3) oraz zawartość substancji nie zmydlających się (2,0%).

WYDZIELENIE I BADANIE FRAKCJI STEROLI

Pozostały olej (80 g) zmydlono przez ogrzanie na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną z dziesięciokrotną ilością 20% etanolowego roztworu wodorotlenku potasu w ciągu 3 godz.

Następnie etanol oddestylowano z parą wodną, zaś alkaliczną pozostałość ekstrahowano eterem etylowym. Po odmyciu wodą wyciągu eterowego osuszono go, a następnie odparowano rozpuszczalnik, uzyskując frakcję nie zmydlającą się (16 g) — patrz schemat 1.

Frakcję nie zmydlającą się rozpuszczono na gorąco w 500 cm³ etanolu 96°, a następnie dodano 1% etanolowy roztwór digitoniny (200 cm³) i ogrzewano w temp. 70°C na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną w ciągu 1 godz. Po tym czasie wydzielił się biały bezpostaciowy osad digitonidów steroli.

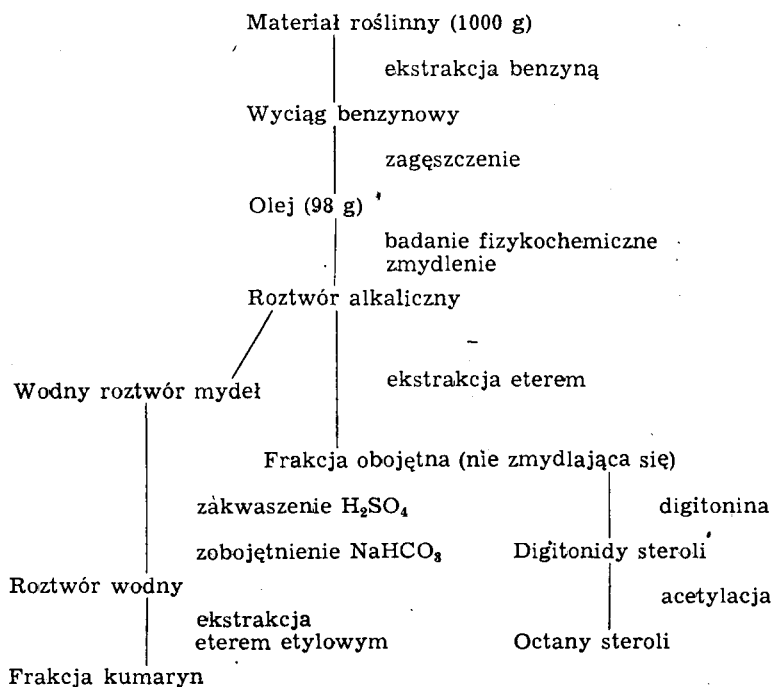
Po sprawdzeniu całkowitości wytrącenia, osad odsączano i przemyto na sączku etanolem, eterem etylowym i acetonem, a następnie wysuszono do stałej masy. Uzyskano w ten sposób 1,875 g digitonidów steroli, co po uwzględnieniu udziału digitoniny w otrzymanym kompleksie stanowi 45,6 mg% zawartości steroli w badanym surowcu. Zespół digitonidów steroli przeprowadzono w octany przez ogrzewanie z dziesięciokrotną ilością bezwodnika octowego. Po przekrystalizowaniu z etanolu uzyskano 0,356 g czystej krystalicznej frakcji octanów steroli.

Rozdział chromatograficzny uzyskanej frakcji octanów steroli przeprowadzono na płytkach pokrytych 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego G, impregnowanego azotanem srebra w stosunku 30 g żelu+10 g AgNO₃+60 g wody. Wysuszone i aktywowane płytki po naniesieniu badanej frakcji rozwijano w układach: eter naftowy—chloroform—kwas octowy (150:50:0,1) oraz benzen—eter naftowy (2:3) i wywoływano przez spryskanie 50% H₂SO₄ i ogrzanie w temp. 105° w ciągu 5—7 min. W wyniku tego uzyskano rozdział badanej frakcji na 5 plam octanów steroli.

W celu izolowania poszczególnych związków, uzyskany zespół naniesiono na kolumnę wypełnioną żelazem krzemionkowym (Koch—Light 325 mesh) i wymywano układem trójskładnikowym stosowanym w technice cienkowarstwowej o składzie: eter naftowy—chloroform—kwas octowy lodowaty (150:50:0,1).

Uzyskano 150 wycieków o objętości 5 cm³ każdy. Wycieki kontrolowano techniką cienkowarstwową. Te wycieki, które zawierały 1 związek lub mieszaninę tych samych związków, łączono, odparowywano rozpuszczalnik i krystalizowano z etanolu.

Schemat 1. Ekstrakcja surowca z wydzieleniem octanów steroli i kumaryn
Extraction of plant material and isolation of sterol acetates and coumarine



Schemat 2. Analiza chromatograficzna frakcji octanów steroli
Chromatographic analysis of sterol acetates fraction

Fracja (0,3 g) Kolumna (SiO_2)				
wycieki 1—23 *	wycieki 24—35	wycieki 36—60	wycieki 61—114	wycieki 115—140
zw. I (R_f 0,64) t.t. 129—131° octan β -dwu- hydrostoste- rolu	mieszanina zw. I (R_f 0,64) zw. II (R_f 0,57)	zw. II (R_f 0,57) t.t. 119—120° Octan β -sitoste- rolu	zw. III (R_f 0,55) octan stigmaste- rolu (?) zw. IV (R_f 0,34)	zw. V (R_f 0,15) octan ergoste- rolu (?)

* Wszystkie wycieki analizowano techniką chromatografii cienkowarstwowej w układzie: eter naftowy—chloroform—kwas octowy (150 : 50 : 0,1).

* All eluates, included here, were analyzed by thin-layer chromatography in the system: oil ether—chloroform—acetate acid (150 : 50 : 0.1).

W ten sposób z połączonych wycieków 1—23 uzyskano jednorodny związek I o t.t. 129—131°C, zgodnej z t.t. wzorcowego octanu β -dwuhydrostosterolu. Związek ten na chromatogramie cienkowarstwowym w dwu różnych układach wykazywał plamę o barwie i wartości R_f zgodnej z plamą wzorca octanu β -dwuhydrostosterolu.

Wycieki 24—35 zawierały mieszaninę dwu związków (I i II).

W wyciekach 36—60 występował jednorodny związek II, który po przekrystalizowaniu topił się w temp. 119—120°C, zgodnej z t.t. wzorcowego octanu β -sitosterolu. Właściwości chromatograficzne związku II były identyczne ze wzorcem octanu β -sitosterolu.

Wycieki 61—114 zawierały mieszaninę 2 związków (III i IV), z których jeden występujący w przewodzie (III) wykazywał na chromatogramie cienkowarstwowym plamę zgodną z barwą i położeniem plamy wzorcowego octanu stigmasterolu.

Wycieki 115—140 zawierały niewielkie ilości związku V, którego wartość R_f odpowiadała wartości R_f wzorcowego octanu ergosterolu.

WYDZIELENIE I BADANIE FRAKCJI KUMARYN

Wodny roztwór mydeł, pozostały po wyekstrahowaniu frakcji obojętnej (schemat 1), zakwaszono 15% kwasem siarkowym, a następnie zobojętniono roztworem NaHCO_3 . Po przesączeniu roztwór ekstrahowano wielokrotnie eterem etylowym. Wyciągi eterowe połączono i po osuszeniu oddestylowano rozpuszczalnik, uzyskując półkrystaliczny żółtopomarańczowy osad frakcji kumaryn (1,2 g). Po przemyciu osadu cykloheksanem frakcję kumaryn poddano analizie chromatograficznej.

Benzenowy roztwór frakcji kumarynowej naniesiono na płytki pokryte 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego G. Chromatogramy rozwijano w układach:

- toluen—kwas mrówkowy—octan etylu (7:1:2);
- benzen—chloroform—octan etylu (70:30:23);
- benzen—octan etylu (17:3).

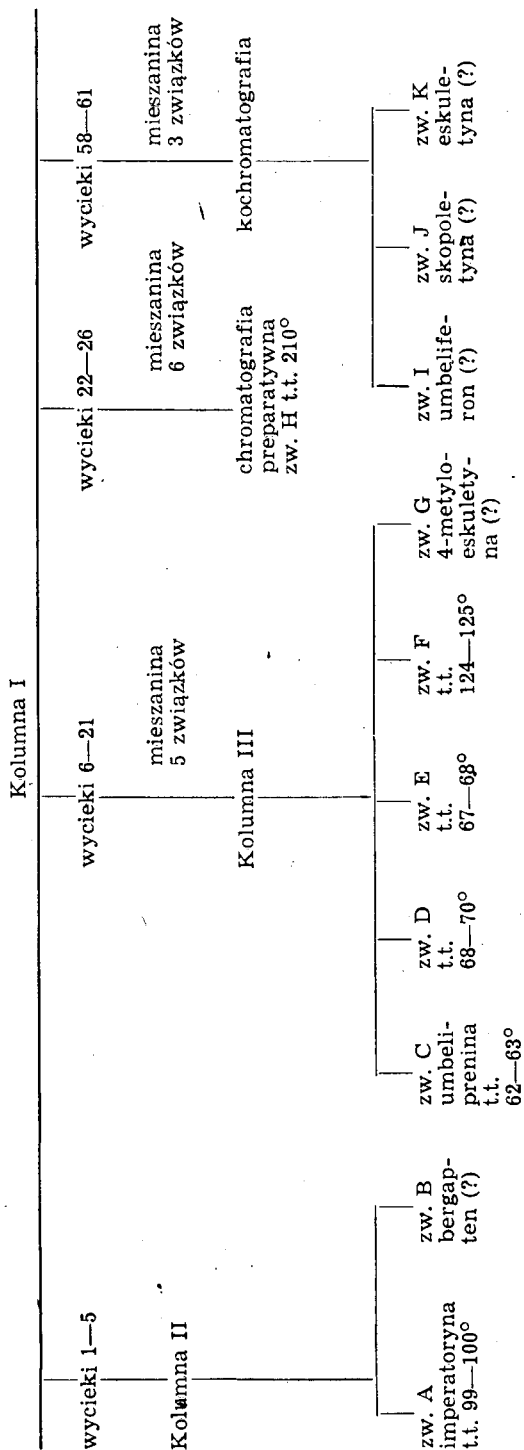
W układzie b uzyskano najlepszy rozdział badanej frakcji na 14 plam, o wartościach R_f w zakresie 0,02—0,78, widocznych w świetle nadfioletowym. Siedem z nich barwiło się ponadto po spryskaniu chromatogramu roztworem jodu w jodku potasowym.

Frakcję kumaryn (1 g) naniesiono na kolumnę I wypełnioną żelem krzemionkowym (firmy Serva 200—300 mesh). Kolumnę wymywano początkowo cykloheksanem (100 cm^3), a następnie cykloheksanem ze wzrastającą ilością octanu etylu (95:5), (90:10), (85:15). Wycieki (każdy obj. 100 cm^3) analizowano techniką cienkowarstwową. Eluaty, zawierające jednorodne związki bądź mieszaniny tych samych związków, łączono i usuwano rozpuszczalnik. W przypadku uzyskiwania mieszanin rozdzielano je ponownie techniką preparatywną bądź kolumnową (schemat 3).

Wycieki 1—5 zawierały mieszaninę 2 związków, które naniesiono ponownie na kolumnę II wypełnioną żelem (firmy Serva 200—300 mesh) i wymywano benzenem. Uzyskano rozdział badanej mieszaniny na 2 krystaliczne związki A i B. Związek A, o t.t. imperatoryny (99—100°C), wykazywał wartości R_f na chromatogramie cienkowarstwowym identyczne z jej wzorcem. Związek B, uzyskany w niewielkiej ilości, był zgodny chromatograficznie ze wzorcem bergaptenu. Potwierdzono to chromatograficznie w trzech różnych układach rozpuszczalników.

Wycieki 6—21 zawierały mieszaninę 5 związków. Wycieki te po połączeniu i odparowaniu rozpuszczalnika, celem ponownego rozdziału, naniesiono na kolumnę III wypełnioną w sposób podany wyżej. Kolumnę wymywano benzenem, a następnie układem benzen—octan etylu (95:5). Z kolumny III uzyskano jednorodny związek C o t.t. 62—63°C, zgodnej z t.t. wzorca umbelipreniny. Związek C wykazywał na chromatogramie cienkowarstwowym plamę o wartości R_f i barwie zgodnej z plamą wzorca umbelipreniny.

Schemat 3. Analiza chromatograficzna frakcji kumarynowej
Chromatographic analysis of coumarine fraction



Dla dalszych wyizolowanych i uzyskanych w postaci krystalicznej 3 związków (związku D — t.t. 68—70°C, związku E o t.t. 67—68°C i związku F o t.t. 124—125°C) nie znaleziono odpowiedników wśród posiadanych wzorców.

Związek G, uzyskany z kolumny III w niewielkich ilościach, odpowiadał chromatograficznie wzorcowi 4-metyloeskuletyny.

Wycieki 22—26 z kolumny I stanowiły mieszaninę 6 związków, z której techniką cienkowarstwową preparatywną wyizolowano związek H o t.t. 210°C.

Wycieki 58—61, zawierające 3 związki, połączono i analizowano metodą kochromatografii z dostępnymi wzorcami. Na płytki nanoszono wycieki, obok nich wzorce, a następnie mieszaninę wycieku i wzorca. Po rozwinięciu w trzech różnych układach rozpuszczalników stwierdzono identyczne wartości R_f związku I z wzorcowym umbeliferonem, związku J ze skopoletyną, zaś związku K ze wzorcem eskuletyny. Małe ilości tych związków nie pozwoliły na ich izolację techniką preparatywną.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W toku badań wyciągu benzynowego z owoców kopru ogrodowego otrzymano olej (10%) i oznaczono jego właściwości fizykochemiczne. Po zmydleniu oleju z uzyskanego roztworu mydeł wydzielono frakcję steroli w postaci octanów, a następnie frakcję kumaryn.

Drogą chromatografii kolumnowej z frakcji octanów steroli wyizolowano octan β -dwuhydroksitosterolu i octan β -sitosterolu oraz chromatograficznie stwierdzono obecność octanu stigmasterolu i octanu ergosterolu. Doniesienia dotyczą tylko obecności β -sitosterolu w badanym surowcu (6).

W wyniku analizy chromatograficznej frakcji kumaryn stwierdzono obecność co najmniej 14 związków. Spośród nich wyizolowano w postaci krystalicznej imperatorynę i umbelipreninę oraz 4 związki nie zidentyfikowane (związki D, E, F, H). Techniką kochromatografii stwierdzono zgodność wartości R_f 5 dalszych związków ze wzorcami, co pozwala wnioskować, iż są to prawdopodobnie bergapten, 4-metyloeskuletyna, umbeliferon, skopoletyna i eskuletyna. W badaniach nad związkami kumarynowymi wykryto w owocach kopru ogrodowego imperatorynę i prawdopodobnie 4-metyloeskuletynę.

PIŚMIENNICTWO

1. Dołgowa A. A., Ładygina E. J.: Rukowodstvo k praktičeskim zaniatijam na farmakognozii. Miedycyna, Moskwa 1977.
2. Dranik L. J., Prokopienko A. P.: Kumaryny i kisloty plodow *Anethum graveolens*. Chim. Prirod. Sojed. 5, 437, 1969.
3. Farmakopea Polska IV. T. II. PZWL, Warszawa 1970.

4. Kamiński B. i wsp.: Poszukiwanie związków kumarynowych w nasionach i owocach. I. Owoce z rodz. Baldaszkwatych (*Umbelliferae—Apiaceae*). Farm. Pol. **34**, 25, 1978.
5. Kartnig Th.: Über einige Lipoid — Inhaltsstoffe aus den Früchten von *Anethum graveolens* L. und *Coriandrum sativum* L. Fette — Seifen — Anstrichmittel **68**, 131, 1965.
6. Kartnig Th.: Ein Beitrag zur Kenntnis der Lipoidinhaltsstoffe einiger Umbelliferenfrüchten. Pharm. Ztg. **31**, 1051, 1965.
7. Szafer W., Kulczyński S., Pawłowski B.: Rośliny polskie. PWN, Warszawa 1969.

Otrzymano 15 XII 1981.

РЕЗЮМЕ

Путем бензиновой экстракции плодов укропа (*Anethum graveolens* L.) получено с 10% производительностью масло и определено его физико-химические свойства. В неомыляющей фракции (2%) находились стеролы (5 соединений), из которых изолировано ацетаты β -ситостерин и β -дигидроситостерин. Методом тонкослойной хроматографии исследовано фракцию кумаринов, получая 14 соединений. Путем хроматографии на колонке изолировано 6 кристаллических соединений, выделяя императорин и умбелипренин. Остальные соединения в числе 5, проявляли хроматографические свойства, отвечая образцом бергаптена, 4-метилоэскулетина, умбелипренина, скополетина и эскулетина.

SUMMARY

By extraction of dill fruits (*Anethum graveolens* L.) with benzine, an oil (10% yield) was obtained, and its physico-chemical properties were estimated. The oil was saponified, and its non-saponifiable fraction (2%) was used for separation of sterol acetates. By thin-layer chromatography five compounds were detected, among which acetates of β -sitosterol and β -dihydrosterol were isolated and identified. In the coumarin fraction obtained by separation 14 compounds were found by chromatographic procedure. By column chromatography 6 crystalline compounds were isolated, one of them being identified as imperatorin and another as umbelliprenin. The next 5 compounds had chromatographic properties similar to those found in the standards of bergapten, esculetin, 4-methylesculetin, umbelliferone and scopoletin.

