

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **236189**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428870**

(22) Data zgłoszenia: **11.02.2019**

(51) Int.Cl.

A61K 36/75 (2006.01)

B01D 11/02 (2006.01)

B01D 15/08 (2006.01)

(54) **Sposób otrzymywania rutamaryny z ziela ruty zwyczajnej (*Ruta graveolens* L.)**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

18.05.2020 BUP 11/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

14.12.2020 WUP 20/20

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

EWELINA KOZIOŁ, Lublin, PL

SIMON LUCA VLAD, Ciurea, RO

KRYSZYNA SKALICKA-WOŹNIAK, Lublin, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Bełz

PL 236189 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania rutamaryny z ziela ruty zwyczajnej (*Ruta graveolens* L.).

Ruta zwyczajna rodzina Rutowate (*Ruta graveolens* L., Rutaceae) jest rośliną wieloletnią występującą naturalnie we wschodniej i południowo-wschodniej części Europy, często uprawiana jako roślina ozdobna. W Polsce jest rośliną uprawianą w celach dekoracyjnych. Ziele ruty zwyczajnej ma długą tradycję stosowana w medycynie ludowej jako środek rozkurczający w obrębie dróg żółciowych, pobudzający trawienie i uspokajający. W dermatologii używana jest w leczeniu łuszczycy i bielactwa. W ziele przeważają trzy frakcje metabolitów wtórnych – flawonoidowa, alkaloidowa i kumarynowa. We frakcji kumarynowej występuje rutamaryna, której działanie przeciwcukrzycowe, przeciwwirusowe i cytotoksyczne (na liniach komórkowych raka płuc, jelita grubego i białaczek) jest opisane w wielu artykułach naukowych (ZHANG, Y., ZHANG, H., YAO, X.G., (+)-Rutamarin as a dual inducer of both GLUT4 translocation and expression efficiently ameliorates glucose homeostasis in insulin-resistant mice. *PLoS One*, 2012, 7.2: e31811; WU, T., WANG, Y., YUAN, Y. Antiviral activity of topoisomerase II catalytic inhibitors against Epstein-Barr virus. *Antiviral Research*, 2014, 107: 95–101; XU, B., WANG L., GONZÁLEZ-MOLLEDA, L. Antiviral activity of (+)-rutamarin against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by inhibition of the catalytic activity of human topoisomerase II. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58.1: 563-573; YUAN, Y., XU, J., INVENTORS. Compositions and methods for treating herpesvirus infection. *PCTInt. Appl. WO*, 2015, 2015081199:A1; RICHARDSON, J. S. M., SETHI G., LEE, G. S. Chalepin: isolated from *Ruta angustifolia* L. Pers induces mitochondrial mediated apoptosis in lung carcinoma cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 16.1: 389; SUHAIMI, S. A., HONG, S. L., MALEK, S. N. A. Rutamarin, an active constituent from *Ruta angustifolia* Pers., induced apoptotic cell death in the HT29 colon adenocarcinoma cell line. *Pharmacognosy magazine*, 2017, 13.Suppl 2: S179; NAKANO, D., ISHITSUKA K., MATSUDA N. Screening of promising chemotherapeutic candidates from plants against human adult T-cell leukemia/lymphoma (V): coumarins and alkaloids from *Boenninghausenia japonica* and *Ruta graveolens*. *Journal of Natural Medicines*, 2017, 71.1: 170–180; WU, T. S., SHI, L. S., WANG J. J. Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Ruta graveolens*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2003, 50.1: 171–178).

Dotychczas rutamaryna izolowana była w wieloetapowych procesach ekstrakcji i izolacji z wykorzystaniem tradycyjnej techniki chromatografii kolumnowej, gdzie kolumna wypełniona była żelem krzemionkowym, bądź z wykorzystaniem preparatywnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Opisano 7 różnych metod otrzymywania rutamaryny w tym 4 z ziela ruty zwyczajnej. W metodzie opisanej przez Yang i wsp. rutamaryna została otrzymana z gatunku *Boenninghausenia sessilicarpa*. Wysuszone nadziemne części zostały poddane 2-godzinnej ekstrakcji 95% alkoholem etylowym w kolbie okrągłodennej pod chłodnicą zwrotną. Otrzymany ekstrakt poddano wieloetapowemu oczyszczaniu na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelem krzemionkowym z użyciem układów eter naftowy/aceton (95:5) otrzymując frakcję pierwszą, F1 oczyszczaną następnie przy użyciu mieszaniny rozpuszczalników składających się z eteru naftowego i acetonu w stosunku (9:1, 3:2, 1:5). Frakcja druga F1.2 z otrzymanej izolacji została poddana dalszemu oczyszczaniu z zastosowaniem mieszaniny eteru naftowego i octanu etylu w stosunku (4:1, 1:1, 1:9). Otrzymana po tym etapie frakcja druga F1.2.2 została znów poddana oczyszczaniu z wykorzystaniem układu eter naftowy/aceton (5:1), co w efekcie dało 1.5 g rutamaryny z 8.4 kg materiału roślinnego (YANG, Q.Y., TIAN, X.Y., FANG, W.S. Bioactive coumarins from *Boenninghausenia sessilicarpa*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2007, 9.1: 59–65). Kolejna metoda prezentowana przez Suhaimi i wsp. jako źródło rutamaryny wykorzystuje ekstrakt otrzymany z całej rośliny *Ruta angustifolia*. Ekstrakcję przeprowadzono przez macerację 90% metanolem przez 72 godziny, a otrzymany ekstrakt poddano wytrząsaniu z *n*-heksanem – otrzymana została frakcja nierozpuszczalna w *n*-heksanie którą poddano wytrząsaniu w układzie 1:1 chloroform/woda. Otrzymana frakcja chloroformowa poddano oczyszczaniu z wykorzystaniem półpreparatywnej HPLC (Agilent XDB-C18 column (9.4 x 250 mm, 5 µm); 4.18 ml/min; 0.1 mL nastrzyk). Rutamarynę wyizolowano po 32.5 minuty. Ze 108,66 g materiału roślinnego otrzymano 9,1 mg rutamaryny. (SUHAIMI, S. A., HONG, S. L., MALEK, S. N. A. Rutamarin, an active constituent from *Ruta angustifolia* Pers., induced apoptotic cell death in the HT29 colon adenocarcinoma cell line. *Pharmacognosy magazine*, 2017, 13.Suppl 2: S179).

Kolejną metodę opisał Richardson i wsp. Wykorzystał on jako materiał roślinny liście gatunku *Ruta angustifolia*. Ekstrakcja była prowadzona podobnie jak w przykładzie powyżej do momentu

otrzymania frakcji rozpuszczalnej w chloroformie. Autor dodatkowo zastosował oczyszczanie ekstraktu z chlorofilu przy pomocy węgla aktywnego. Podobnie jak powyżej rutamarynę otrzymano w 32.5 minucie po zastosowaniu pół-preparatywnej HPLC (Agilent XDB-C18 column (9.4 x 250 mm, 5 μ m); 4.18 mL/min; 0.1 mL injection), lecz wydajność jest nieznana. (RICHARDSON, J. S. M., SETHI G., LEE, G. S. Chalepin: isolated from *Ruta angustifolia* L. Pers induces mitochondrial mediated apoptosis in lung carcinoma cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 2016, 16.1: 389).

Kolejne przykłady opisują izolację z wykorzystaniem gatunku *Ruta graveolens* L. Rollinger i wsp. w 2009 r. otrzymali dichlorometanowo-metanolowy ekstrakt przez odtłuszczenie wysuszonych nadziemnych części rośliny eterem naftowym i dwuetapową macerację kolejno dichlorometanem i metanolem (dwukrotnie każdego dnia, przez 3 dni). Ekstrakt został poddany oczyszczaniu na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym z użyciem metanolu, w wyniku czego otrzymano 13 frakcji. Frakcja 10 zawierająca rutamarynę została dodatkowo oczyszczona na kolumnie z Sephadexem w układzie chloroform/aceton (85:15). Wydajność całości procesu wynosiła 0,044%. (ROLLINGER, J.M., SCHUSTER D., DANZL B. In silico target fishing for rationalized ligand discovery exemplified on constituents of *Ruta graveolens*. *Planta medica*, 2009, 75.3: 195).

W 2003 roku Wu i wsp. n-heksanowy ekstrakt otrzymany przez wstępną ekstrakcję ziela ruty z metanolem, a następnie wytrząsanie z n-heksanem, poddali oczyszczaniu na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelem krzemionkowym. Wykorzystano układy rozpuszczalników n-heksan/aceton, eter diizopropylowy/n-heksan (1:20), eter diizopropylowy/benzen (1:20). Wydajność procesu wynosiła 0.0003%. (WU, T. S., SHI, L. S., WANG J. J. Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Ruta graveolens*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2003, 50.1: 171–178).

W 2015 roku Mancuso i wsp. poddali ekstrakcji liście, łodygi i owoce ruty zwyczajnej poprzez 48 godziną macerację w metanolu w temperaturze pokojowej. Ekstrakt został oczyszczony na kolumnie chromatograficznej z żelem krzemionkowym z wykorzystaniem układów rozpuszczalników n-heksan/octan etylu w gradiencie od 7:3 do 0:1. Wydajność procesu była najwyższa dla owoców i wynosiła 0.0044%. (MANCUSO, G., BORGONOVO, G., SCAGLIONI L. Phytochemicals from *Ruta graveolens* activate TAS2R bitter taste receptors and TRP channels involved in gustation and nociception. *Molecules*, 2015, 20.10: 18907–18922.) Najbardziej efektywną dotychczas metodę otrzymywania rutamaryny opisał w 2017 roku Nakano i wsp. Korzenie ruty zwyczajnej zostały poddane ekstrakcji metanolem pod chłodnicą zwrotną, następnie metanolowy ekstrakt wytrząsano z octanem etylu i frakcję octanową oczyszczano na kolumnie chromatograficznej podobnie jak w poprzednich przypadkach. Zastosowano układ rozpuszczalników heksan/octan etylu (13:2) i heksan/aceton (6:1). Wydajność procesu wynosiła 0.045%. (NAKANO, D., ISHITSUKA K., MATSUDA N. Screening of promising chemotherapeutic candidates from plants against human adult T-cell leukemia/lymphoma (V): coumarins and alkaloids from *Boenninghausenia japonica* and *Ruta graveolens*. *Journal of Natural Medicines*, 2017, 71.1: 170–180; WU, T. S., SHI, L. S., WANG J. J. Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Ruta graveolens*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2003, 50.1: 171–178).

Metody te były uciążliwe i długotrwałe. Wieloetapowość opisanych procesów zwiększała prawdopodobieństwo pomyłki i zwiększała straty izolowanej substancji. We wszystkich opisanych metodach została wykorzystana chromatografia stałego złoza, co zwiększa prawdopodobieństwo nieodwracalnej adsorpcji substancji na kolumnie chromatograficznej. W konsekwencji wydajność otrzymywanej substancji była na niskim poziomie, więc metody nie nadawały się do preparatyki większej ilości związku.

Przedmiotem wynalazku jest proces izolacji rutamaryny przy zastosowaniu techniki wysokosprawnej chromatografii przeciwprądowej (high performance counter-current chromatography-HPCCC). Okazało się, że zastosowanie techniki chromatografii przeciwprądowej do izolacji rutamaryny z metanolowego ekstraktu otrzymanego z ziela ruty zwyczajnej daje dwukrotnie wyższą niż dotychczas opisywana wydajność procesu oraz pozwala uzyskać rutamarynę o wysokiej czystości.

Sposób izolacji rutamaryny według wynalazku polega na trzech etapach. W pierwszym wysuszone, rozdrobnione ziele ruty zwyczajnej zebrane w trakcie kwitnienia poddaje się ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami z użyciem dichlorometanu. Ekstrakcji dokonuje się korzystnie trzykrotnie (30 minut), świeżymi porcjami ekstrahenta. Ekstrakt poddaje się rozdzielaniu przy użyciu wysokosprawnej chromatografii przeciwprądowej z dwufazową mieszaniną rozpuszczalników o składzie n-heksan/octan etylu/metanol/woda, które występują odpowiednio w stosunku od 5:2:5:2 do 4:1:4:1 (v/v/v) korzystnie 3:1:3:1 (v/v/v), przy czym ekstrakt przed rozdzielaniem rozpuszcza się

w próbce mieszaniny rozpuszczalników o takim samym składzie jak dwufazowa mieszanina rozpuszczalników, lub tylko w fazie górnej lub dolnej stosowanego układu rozpuszczalników, korzystnie w mieszaninie o równym stosunku obu faz, a rozdzielanie prowadzi się w układzie faz odwróconych, w temperaturze 25–35°C korzystnie 26°C. Następnie po rozdzieleniu zbiera się frakcje zawierające rutamarynę.

Korzystnie, gdy rotację kolumny prowadzi się przy maksymalnej ilości obrotów kolumny, korzystnie 1600 rpm.

Korzystnie, gdy po rozdzieleniu frakcje odpowiadające eluowanemu związkowi – rutamarynie zbiera się przy prędkości przepływu 6 ml/min od pojawienia się na chromatogramie pierwszego piku.

Rozdzielenie monitoruje się przy długości fali 335 nm, rutamarynę izoluje się w czasie do 43 minut.

Proponowana metoda pozwala uzyskać rutamarynę o wysokiej czystości do 98.96% i wydajności procesu na poziomie 0.081%. Ponadto metoda według wynalazku pozwala zredukować czas izolacji. Nadaje się do zastosowania w warunkach na skalę przemysłową. Efekty te są możliwe dzięki zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii przeciwprądowej z układem rozpuszczalników: n-heksan, octan etylu, metanol, woda i ekstraktu z ziela ruty zwyczajnej jako źródła związku.

Zastosowanie układu ciecz-ciecz i brak fazy stałej jako fazy stacjonarnej zapewnia bezstratne pozyskanie czystego związku w krótkim czasie.

Rutamaryna ze względu na swoje właściwości lecznicze może być wykorzystana jako lek lub składnik leku o potencjalnym działaniu przeciwwirusowym, przeciwnowotworowym i przeciw cukrzycowym.

Przykład

W pierwszym etapie wysuszone, rozdrobnione ziele ruty zwyczajnej zebrane w trakcie kwitnienia poddano ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami z użyciem dichlorometanu. Ekstrakcję wykonano trzykrotnie (30 minut), świeżymi porcjami ekstrahenta.

W rozdzielaczu przygotowano dwufazowy układ rozpuszczalników będący mieszaniną heksanu, octanu etylu, metanolu i wody w stosunku 3:1:3:1 (v/v). Po wytrząśnięciu i rozdzieleniu faz, fazę górną i dolną zebrano do dwóch oddzielnych, opisanych butelek. Butelki umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na 10 minut w celu pozbycia się pęcherzyków powietrza. Po wypełnieniu kolumny fazą stacjonarną, fazą górną układu dwufazowego), włączono obroty kolumny, które stopniowo zwiększano do 1600 rpm. Następnie wypełniano kolumnę fazą ruchomą (faza dolna układu dwufazowego) z prędkością przepływu 6 ml/min. Po osiągnięciu przez układ stanu równowagi, czyli momentu w którym nie wypływa faza stacjonarna, do kolumny zadozowano 100 mg ekstraktu rozpuszczonego w mieszaninie złożonej z 3 ml fazy górnej i 3 ml fazy dolnej. Zbierano jednominutowe frakcje przy prędkości przepływu 6 ml/min od pojawienia się na chromatogramie pierwszego piku. Detekcję związków prowadzono przez pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 335$ nm. Izolację prowadzono w temperaturze 26°C. Frakcje identyfikowano z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC, spektrometrii mas ESI-Q-TOF-MS i magnetycznego rezonansu jądrowego $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C NMR}$.

Wydajność procesu wynosiła 0,068%. Po zadozowaniu do kolumny 100 mg ekstraktu otrzymano 2,39 mg rutamaryny o czystości 99.36% w czasie 24 minut.

Rozdzielenie monitoruje się przy długości fali 335 nm. Rutamarynę izoluje się w czasie do 24 minut. Możliwe jest dzięki temu otrzymanie rutamaryny o czystości do 99.36%.

Na rysunku na fig. 1 pokazano wykres, który przedstawia pik czystej rutamaryny wyizolowanej w sposób podany w przykładzie, zaś na fig. 2 widmo UV-DAD czystego związku.

Proponowana metoda jest procesem szybkim, tanim, przyjaznym ekologicznie, pozwala zredukować koszty i czas izolacji, jest odpowiednia do przeniesienia warunków na skalę przemysłową. Rutamaryna wykorzystana może być w lecnictwie jako lek o potencjalnym działaniu przeciwwirusowym, przeciwnowotworowym i przeciw cukrzycowym.

Zastrzeżenia patentowe:

1. Sposób izolacji rutamaryny obejmujący ekstrakcję, **znamienny tym**, że rozdrobnione ziele ruty zwyczajnej poddaje się najpierw ekstrakcji dichlorometanem wspomaganej ultradźwiękami w znany sposób i otrzymany ekstrakt rozdziela się przy użyciu wysokosprawnej chromatografii przeciwprądowej z dwufazową mieszaniną rozpuszczalników o składzie n-heksan

lub n-heptan, octan etylu, metanol, woda które występują odpowiednio w stosunku od 5/2/5/2 do 4/1/4/1 (v/v/v) korzystnie 3/1/3/1 (v/v/v), przy czym ekstrakt przed rozdzielaniem rozpuszcza się w próbce mieszaniny rozpuszczalników o takim samym składzie jak dwufazowa mieszanina rozpuszczalników, albo w jednej z faz stosowanego układu rozpuszczalników, a rozdzielanie prowadzi się w układzie faz odwróconych, stosując rotację kolumny aż do uzyskania stanu równowagi faz, w temperaturze 25–35° C korzystnie 26°C, następnie po rozdzieleniu zbiera się frakcje stanowiące rutamarynę.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że ekstrakcję przeprowadza się trzykrotnie.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że rotację kolumny prowadzi się przy maksymalnej ilości obrotów kolumny.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że rotację kolumny prowadzi się przy obrotach 1600 rpm.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że po rozdzieleniu frakcje stanowiące rutamarynę zbiera się przy prędkości przepływu 6 ml/min od pojawienia się na chromatogramie pierwszego piku.

Rysunki

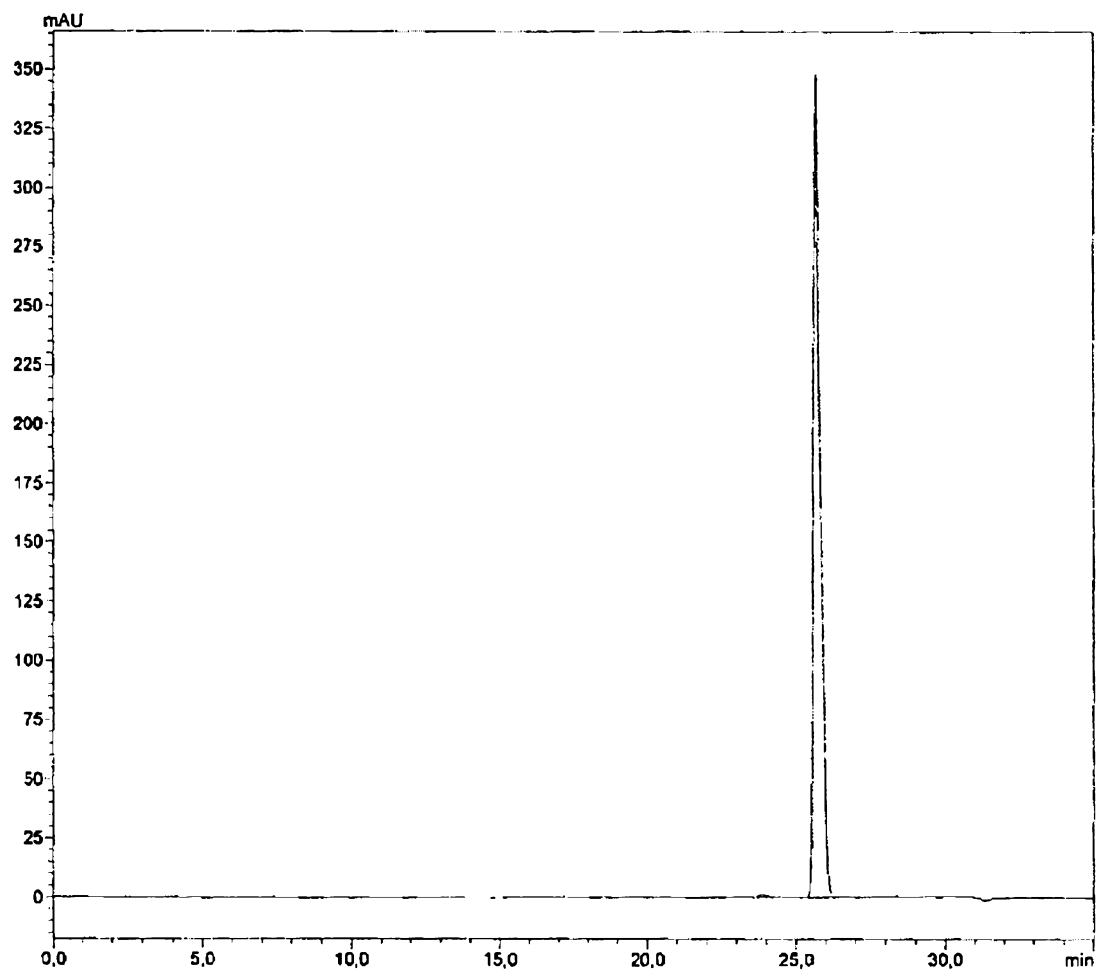
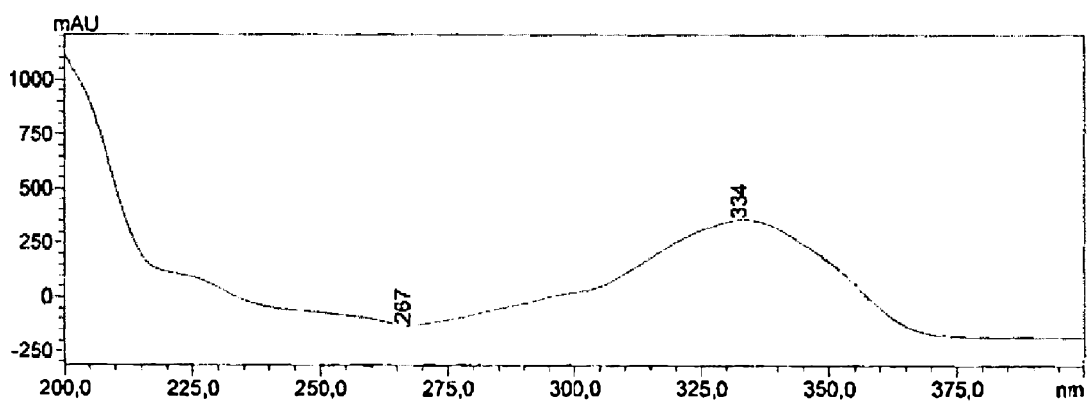


Fig.1



Chromatogram HPLC –DAD rutamaryny (czas retencji 25,5min) czystość 99.36%

Fig.2