

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA KASTELIC

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA KASTELIC

**OPTIMIZACIJA IZOLACIJE PROANTOCIANIDINOV IZ SKORJE
NAVADNE SMREKE (*Picea abies*, (L.) Karst.)**

**OPTIMISATION OF PROANTHOCIANIDINS ISOLATION FROM
SPRUCE BARK (*Picea abies*, (L.) Karst.)**

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom doc. dr. Andreja Umeka, mag. farm. In somentorstvom asist. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Andreja Umeka, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Janja Kastelic

Predsednik komisije: prof. dr. Danijel Kikelj

Član komisije: izr. prof. dr. Vojko Kmetec

Ljubljana, 2008

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 RADIKALI	1
1.1.1 Posledice delovanja radikalov	3
1.2 ANTIOKSIDANTI	5
1.2.1 Pregled antioksidantov	5
1.2.2 Polifenoli kot antioksidanti.....	10
1.2.2.1 Flavonoidi.....	11
1.2.2.2 Proantocianidini	15
1.2.3 Viri antioksidantov	15
1.3 PIKNOGENOL.....	16
1.4 NAVADNA SMREKA (<i>PICEA ABIES</i> (L.) KARST.)	17
2 NAMEN DELA	22
3 MATERIALI IN METODE	23
3.1 RASTLINSKI MATERIAL.....	23
3.2 APARATURE IN OPREMA	23
3.3 KEMIKALIJE.....	23
3.4 METODE.....	24
3.4.1 Postopek izolacije polifenolnih spojin iz skorje navadne smreke	24
3.4.2 Določanje vsebnosti polifenolnih spojin s Folin-Ciocalteu-jevo metodo (19)	25
3.4.3 Določanje antioksidativne aktivnosti polifenolnih spojin z DPPH metodo (20).....	26
3.4.4 Oboritev proantocianidinov s topili, ki bi lahko nadomestila kloroform	27
3.5 EKSPERIMENTALNO DELO	28
3.5.1 Priprava ekstrakta iz skorje navadne smreke po patentnem postopku za piknogenol	28

3.5.1.1	<i>Določanje vsebnosti polifenolnih spojin s Folin-Ciocalteau-jevo metodo</i>	28
3.5.1.2	<i>Določanje antioksidativne aktivnosti polifenolnih spojin z DPPH metodo</i>	30
3.5.2	<i>Optimizacija izolacije polifenolnih spojin iz skorje navadne smreke</i>	31
3.5.2.1	<i>Priprava ekstrakta iz skorje navadne smreke s potencialno nadomestnimi topili ...</i>	31
3.5.2.2	<i>Priprava ekstraktov z izbranimi topili</i>	32
3.5.2.3	<i>Optimizacija volumna pentana za obarjanje antioksidantov.....</i>	32
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	33
4.1	PRIPRAVA SUHEGA EKSTRAKTA IZ SKORJE NAVADNE SMREKE.....	33
4.2	OPTIMIZACIJA VOLUMNA PENTANA ZA OBARJANJE ANTI-OKSIDANTOV	36
5	SKLEPI	41
6	LITERATURA	42

POVZETEK

Brez kisika življenje ni možno, vendar pri njegovi porabi v celicah nastajajo izredno agresivne molekule, ki nam škodijo. To so radikali, ki lahko nastanejo iz vsakega atoma ali molekule, ki je izgubila elektron. Največ jih nastane med izgorevanjem kisika, ko iz hranilnih snovi nastaja energija. Organizem se proti radikalom bori z lastnimi antioksidantnimi sistemi in z antioksidanti, ki jih v telo vnašamo predvsem s sadjem in zelenjavo. V zadnjem času pa je velik poudarek tudi na prehranskih dopolnilih.

Proantocianidini so zaradi močnega antioksidativnega delovanja pogosto sestavina prehranskih dopolnil. Eden glavnih virov je ekstrakt obmorskega bora, ki ga poznamo pod imenom zaščitenim imenom Pycnogenol[®]. Namen naše naloge je bil izolirati proantocianidine iz skorje navadne smreke ter njihovo delovanje primerjati s piknogenolom. Celokupno vsebnost polifenolov smo določali s Folin-Ciocalteu-jevo metodo, njihovo antioksidativno delovanje pa z DPPH metodo.

Ekstrakt iz ročno lupljene skorje navadne smreke smo najprej pripravili po patentnem postopku za piknogenol, nato pa kloroform, ki se uporablja kot topilo za obarjanje, poskušali nadomestiti z učinkovitejšim in varnejšim topilom. Kot najbolj učinkovit se je izkazal pentan.

Preučevali smo tudi količino pentana potrebnega za oboritev proantocianidinov. Kot optimalni volumen smo določili razmerje med ekstraktom in topilom 1 : 3. Glede vsebnosti polifenolov je na prvem mestu produkt pripravljen s pentanom, s kloroformom jih oborimo 3-krat manj. Kar se tiče antioksidativne aktivnosti pa sta produkta zelo primerljiva, Pycnogenol[®] je namreč le 1,2-krat močnejši od produkta pridobljenega po patentnem postopku in le 1,3-krat od produkta, ki smo ga oborili s pentanom.

ABSTRACT

Life without oxygen is not possible, but extremely aggressive molecules with harmful effects to people are produced with the consumption of it in cells. These molecules are free radicals, which are produced from every atom or molecule that has lost an electron. The most free radicals are produced with oxygen combustion, when energy is arisen from nutritive substances. The organism resists the free radicals with antioxidants, which are found mostly in fruit and vegetables and also in nutrition supplements.

Proanthocyanidins are often an ingredient of nutrition supplement due to their strong antioxidant effect. One of the main sources is the Maritime Pine extract, also known as Pycnogenol[®]. The purpose of this BA thesis was to isolate proanthocyanidins from the bark of the spruce and to compare the effects with Pycnogenol. The entire amount of polyfenols was determined by the Folin-Ciocalteu method and their antioxidant effect by the DPPH method.

The extract of the hand peeled spruce bark was first prepared according to the patented procedure for pycnogenol. Afterwards, we attempted to replace chloroform, which is used as a solvent for precipitation, with a more efficient and safer solvent. Pentane was proved to be the most efficient.

The amount necessary for the precipitation of proanthocyanidins was also examined. The optimum volume between the ration of the extract and solvent was determined at 1 : 3. From the perspective of the amount of polyfenols, the product prepared with pentane was *in the first place*; if chloroform is used, the amount of the precipitation is three times smaller. From the perspective of the antioxidant effect, the products are comparable as pycnogenol is 1.2 times stronger than the product prepared according to the patented procedure for pycnogenol and 1.3 times stronger than the product precipitated with pentane.

SEZNAM OKRAJŠAV

DNA – deoksiribonukleinska kislina

DP – (degree of polymerisation) stopnja polimerizacije

DPPH – (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

FC – Folin-Ciocalteu-jev reagent

LP – lipidna peroksidacija

1 UVOD

1.1 RADIKALI

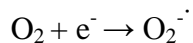
Radikali so atomi, ioni in molekule ali njihovi deli, ki imajo na vsaj enem od energijskih nivojev elektronov en sam, nesparjen elektron – nesparjeno spinsko število, ki je vzrok njihove izrazite kemijske reaktivnosti. Njihov razpolovni čas je v območju mikro- do milisekund, obstajajo pa tudi taki z daljšimi razpolovnimi časi. V primeru, ko radikali nastajajo kot del metabolizma celic, lahko le-ti zelo poškodujejo celične sestavine (1).

Reakcije nastajanja radikalov (2):

- homolizna cepitev: $A : B \rightarrow A^{\cdot} + B^{\cdot}$
- redukcija: $A + e^{-} \rightarrow A^{\cdot -}$
- ionizacija: $A + h\nu \rightarrow A^{+ \cdot} + e^{-}$

Primer molekule, ki lahko sprejema in se v več stopnjah reducira do vode je kisik. Reaktivne kisikove spojine so snovi, ki nastajajo v različnih procesih v celicah in pod določenimi pogoji lahko tvorijo radikale. Najpogostejša radikala v organizmu sta superoksidni anionski radikal in hidrosilni radikal. Slednji je zaradi svoje velike kemične reaktivnosti tudi najnevarnejši.

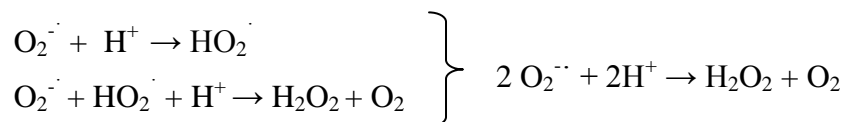
Superoksidni anion (Tabela I) nastaja z enostopenjsko redukcijo molekularnega kisika:



Elektron je lahko endogenega izvora (oksidazna encimska reakcija) ali eksogenega izvora (ionizirajoče sevanje). Superoksidni radikal nastaja v mitohondrijih, v endoplazemskem retikulumu, v celičnih membranah vzbujenih fagocitov, v peroksisomih, v plazemskih membranah, z avtooksidacijo hemoglobina in mioglobina, z avtooksidacijo hidrokinonov in na druge načine. Je radikal, ki se v telesu tvori v največji meri in je posredno pomemben pri

številnih poškodbah celic in tkiv. Večino biokemijskih poškodb namreč povzročijo druge reaktivne spojine, ki nastanejo pri reakciji superoksidnega aniona.

Običajno superoksidni radikal odstranjuje encim superoksid dismutaza, ki v reakciji dismutacije pretvori dve molekuli superoksida v molekulo kisika in vodikovega peroksida.



Vodikov peroksid lahko difundira s kraja nastanka in kot električno nevtralna zvrst prehaja skozi membrane, medtem ko superoksidni radikal ne more, razen če so v membrani ustrezni ionski kanali. (1)

Hidroksilni radikal OH^{\cdot} (Tabela I) je zelo reaktiven in lahko reagira skoraj z vsako biološko molekulo. Reagira z odvzemanjem, dodajanjem ali prenosom elektronov(3):



Radikali pa nastajajo tudi pod vplivom ionizirajočih žarkov, nastajajo lahko posredno ali neposredno. Posredno radikali nastajajo pri radiolizi vode:

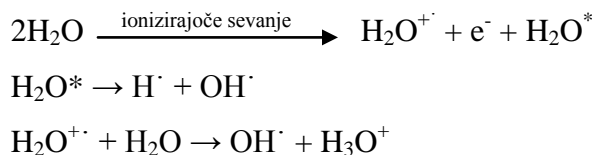


Tabela I: Pregled nekaterih kisikovih radikalov in reaktivnih kisikovih spojin (3).

Kisikovi radikalni		Reaktivne kisikove spojine	
$O_2^{\cdot -}$	superoksidni anionski radikal	O_3	Ozon
HO^{\cdot}	hidroksilni radikal	H_2O_2	vodikov peroksid
HO_2^{\cdot}	hidroperoksidni radikal	$HOCl$	hipoklorna kislina
ROO^{\cdot}	peroksidni radikal	$ROOH$	Hidroperoksid
RO^{\cdot}	alkoksi radikal	$ROOR$	Peroksid
ArO^{\cdot}	ariloksidni radikal	$ONOO^{\cdot}$	Peroksinitrit
UQ^{\cdot}	semikinonski radikal		
$^1O_2^{\cdot}$	vzbujena oblika singletnega kisika		
NO^{\cdot}	dušikov oksid		

1.1.1 Posledice delovanja radikalov

Zaradi težnje po pritegnitvi še enega elektrona so kratkoživi in zelo kemijsko reaktivni. Ponavadi reagirajo s snovmi, v svoji neposredni bližini na naslednje načine:

- pritegnejo vodikov atom iz neke spojine: $R_1^{\cdot} + R_2-H \rightarrow R_1-H + R_2^{\cdot}$

- se adirajo na dvojno vez: $R\cdot + CH_2 = CH-R_1 \rightarrow R-CH_2-CH\cdot-R_1$
- reagirata dva med sabo: $R_1\cdot + R_2\cdot \rightarrow R_1-R_2$

Prvi dve reakciji vodita v nastanek stabilnejših in manj reaktivnih radikalov, pri zadnji pa nastane nova nereaktivna spojina (2).

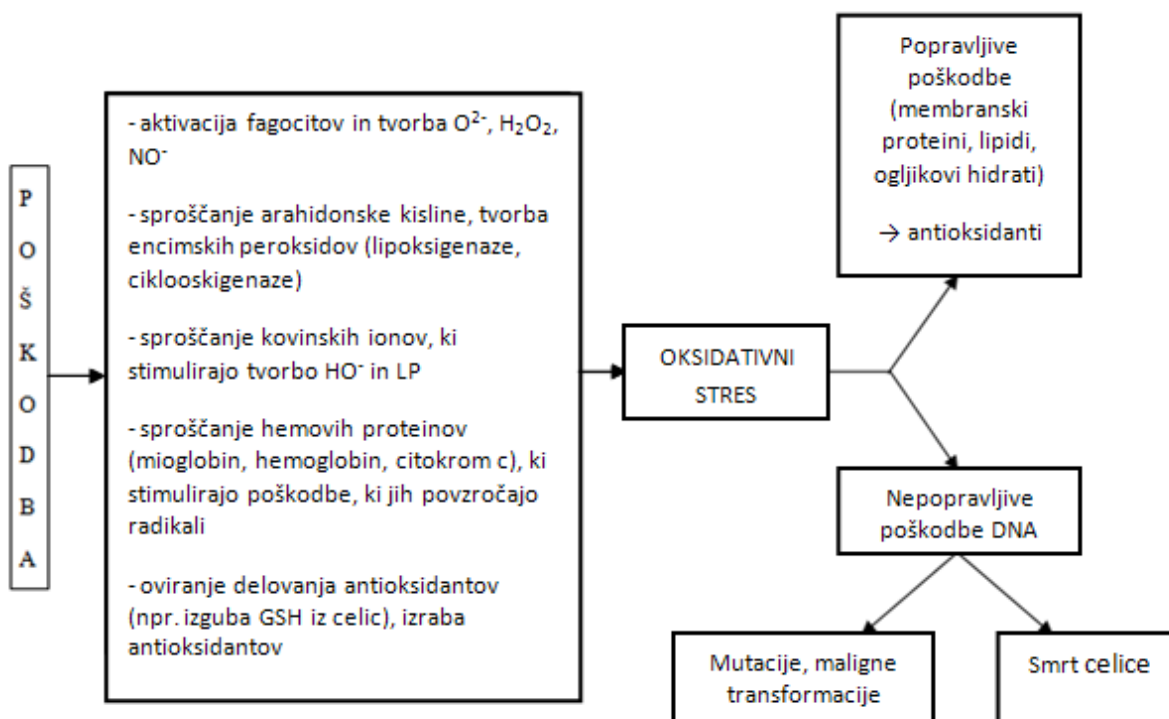
Radikali so intermediati pri oksido-redukcijskih, fotokemijskih in radikalskih reakcijah in se pojavljajo pri vrsti biokemijskih procesov. V nenormalnih, bolezenskih stanjih, je njihovo število v organizmu močno povečano in proces nastajanja poteka nenadzorovano, kar je za celico škodljivo zaradi njihovega nenadzorovanega delovanja ali zaradi izrabe obrambne kapacitete fizioloških antioksidantov. Temu pojavu pravimo oksidativni stres (4).

Pri oksidativnem stresu pride do motenj v delovanju celic, do poškodb DNA, do lipidne peroksidacije in poškodb membranskih transportnih sistemov ter povečanja koncentracije kalcijevih ionov v celici (1).

Začetek lipidne peroksidacije je odvzem atoma vodika iz verige maščobnih kislin, najverjetneje v reakciji z $OH\cdot$. Posledica je zmanjšana fluidnost in prožnost membran. V procesu so pomembni tudi železovi in bakrovi ioni, ki katalizirajo reakcije superoksidnega aniona in vodikovega peroksida. (3)

Kisikovi radikali povzročajo staranje, razvoj kroničnih bolezni kot so diabetes, ateroskleroza, hipertenzija, revmatoidni artritis, Parkinsonova in Alzheimerjeva bolezen ter maligna obolenja.

Celice se pred škodljivimi učinki radikalov branijo z encimi in z naravnimi antioksidanti, pogosto pa je potrebno antioksidante v telo vnašati tudi s hrano.



Slika 1: Poškodba tkiva in oksidativni stres (1).

1.2 ANTIOKSIDANTI

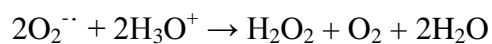
1.2.1 Pregled antioksidantov

Antioksidanti (Tabela II) so snovi, ki ščitijo človeško telo pred oksidativnimi poškodbami, ki jih povzročajo radikali. Preprečujejo, zmanjšujejo ali ustavljajo verižne reakcije, sprožene s radikali (3).

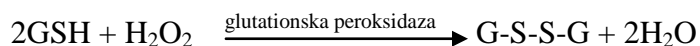
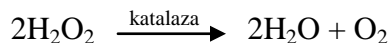
Tabela II: Pregled in lokacija antioksidantov (3).

V CELICI	V CELIČNI MEMBRANI	ZUNAJ CELICE
superoksidne dismutaze	α -tokoferol	ceruloplazmin (inaktivirana Cu^+ in deloma Fe^{2+})
katalaza	karotenoid	transferin in laktoferin, ki vežeta Fe^{2+}
glutationska peroksidaza	estri askorbinske kisline	hemopeksin in haptoglobin, ki vežeta hem
		ekstracelularna superoksidna dismutaza (malo aktivna)
		askorbinska kislina
		α -tokoferol, raztopljen v plazemskih lipidih
		mukus, ki lovi OH^\cdot

Encimski antioksidanti z odstranjevanjem $\text{O}_2^{\cdot -}$ in H_2O_2 onemogočajo nastajanje radikalov OH^\cdot . Udeležena sta dva tipa encimov, hidroksiperoksidaze (katalaza in peroksidaze) in superoksidna dismutaza. Superoksidne dismutaze so metaloproteini, ki katalizirajo naslednjo reakcijo:



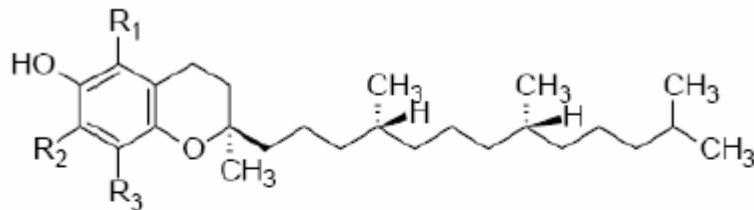
Katalaza razgrajuje H_2O_2 , glutationska peroksidaza pa ga odstranjuje tako da ga porablja za oksidacijo glutationa:



Neencimski antioksidanti delujejo na različne načine (1):

- zmanjšajo lokalne koncentracije kisika
- preprečujejo sprožitev LP z lovljenjem radikalov, ki bi lahko sprožili LP
- vežejo kovinske ione v oblike, ki ne morejo sodelovati pri sprožitvi ali pri širjenju peroksidacije
- razgrajujejo perokside tako, da jih spremenijo v produkte, ki niso radikali
- prekinjajo verižne reakcije in tako preprečujejo nadaljnji odcep vodikovega atoma

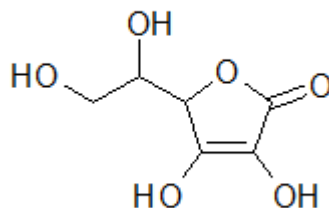
Vitamin E (Slika 2) je lipidotopen vitamin. Obstaja v osmih različnih oblikah, najbolj aktivna oblika je α -tokoferol (Slika 2), katerega glavna naloga je varovanje celice pred lipidno peroksidacijo. Reagira s singletnim kisikom, s superoksidom, s hidroksilnim radikalom, reducira bakrove ione med oksidacijo lipidov, njegova najpomembnejša vloga pa je reakcija s sekundarnimi peroksilnimi in alkoksilnimi radikali. Reagira tako, da pritegne elektron in nastane stabilnejši tokoferil radikal, kjer je prosti elektron stabiliziran z delokalizacijo v aromatskem obroču. Ta se lahko razgradi sam ali pa ga nazaj reducira vitamin C, GSH ali ubikinol. (1)



R ₁	R ₂	R ₃	
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α - tokoferol
CH ₃	H	CH ₃	β - tokoferol
H	CH ₃	CH ₃	γ - tokoferol
H	H	CH ₃	δ - tokoferol

Slika 2: Strukturna formula tokoferolov (4).

Vitamin C (askorbinska kislina) predstavljen na Sliki 3, je zelo pomemben antioksidant, ki deluje v zunajcelični tekočini. Preprečuje oksidacijo lipidov v lipoproteinih majhne gostote in s tem ateroskleroza. Deluje v sodelovanju z vitaminom E, tako da regenerira α-tokoferol radikal.



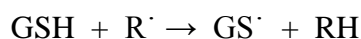
Slika 3: Strukturna formula vitamina C.

Vitamin C lahko v navzočnosti Fe^{3+} in Cu^{2+} v vodnih raztopinah deluje kot prooksidant. Kakšno bo njegovo delovanje je torej odvisno od koncentracije teh dveh ionov. Če bo

koncentracija askorbata v primerjavi s koncentracijo kovinskih ionov majhna bo deloval kot prooksidant, v primeru velike koncentracije pa kot antioksidant (3).

Glutation je najpomembnejši tiolni antioksidant. V jedru celice zagotavlja reducirano stanje proteinskih sulfhidrilnih skupin, ki so nujne za ekspresijo in popravljanje DNA. Oksidacijsko kapaciteto zagotavlja žveplov atom, ki se lahko prilagodi izgubi elektrona.

Reakcija glutathiona z radikalom:

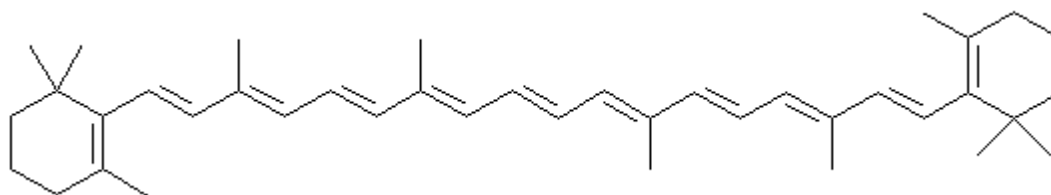


Nastali radikal dimerizira do spojine, ki ni radikal, oksidiranega glutathiona:



Sicer pa glutathion deluje kot kofaktor detoksifikacijskim encimom, ki sodelujejo v procesu preprečevanja oksidativnega stresa, sodeluje pri prenosu aminske skupine skozi membrane, je neposredni lovilec hidroksilnega radikala in singletnega kisika, sposoben pa je tudi regeneracije vitaminov C in E (4).

Karotenoidi (npr. β -karoten, prikazan na Sliki 4), so poznani kot rastlinska barvila, so pa tudi dobri lovilci radikalov in tako preprečujejo nastanek določenih oblik raka, ateroskleroze in s starostjo povezano degeneracijo mišic. Njihova antioksidativna sposobnost izvira iz njihove strukture konjugiranih dvojnih vezi, ki so sposobne delokalizacije neveznega elektrona. Antioksidativno delujejo pri nizkih parcialnih tlakih kisika, sicer so prooksidanti (4).

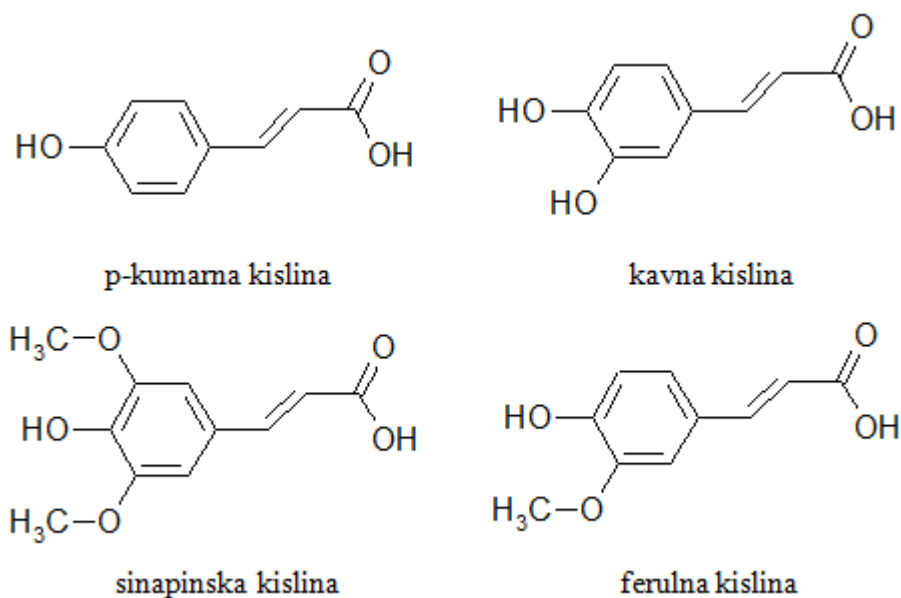


Slika 4: Strukturna formula β -karotena.

1.2.2 Polifenoli kot antioksidanti

Poznanih je več tisoč različnih molekul s polifenolno strukturo. Te molekule so sekundarni metaboliti rastlinske presnove. Nastajajo po dveh biosinteznih poteh. Po prvi preko šikimata nastaneta aminokislini fenilalanin in tirozin, iz teh dveh pa po deaminaciji cimena kislina in njeni derivati: benzojska kislina, acetofenoni, lignani, lignini in kumarini. Po drugi poti, ki se začne z acetatom pa preko poli- β -ketoestra s ciklizacijo nastanejo kromoni, izokumarini, orcinoli, ksantoni, depsidoni in kinoni (5)

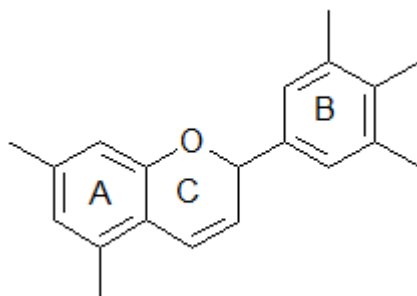
Polifenole lahko razdelimo na fenolne kisline, flavonoide, stilbene in lignane. Med fenolnimi kisljinami (Slika 5) so bolj kot hidoksibenzojske pomembnejše hidoksicimetne kisline: *p*-kumarna kislina, kavna, ferulna in sinapinska kislina. Najdemo jih lahko v skoraj vseh delih rastlin (6).



Slika 5: Fenolne kisline.

1.2.2.1 Flavonoidi

Flavonoidi so derivati 2-fenil-benzopirana, ki je sestavljen iz pirana, na katerega je kondenziran benzen, na C2 pa je vezan fenilni obroč. Med sabo se razlikujejo po stopnji oksidacije piranovega obroča.



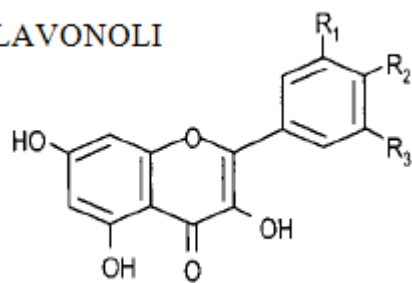
Slika 6: 2-fenilbenzopiran.

Flavonoide (Slika 7) lahko razdelimo v dve skupini. S flavonoidi v ožjem pomenu mislimo flavone, izoflavone, flavonole, flavanone in flavanonole. Med flavonoide v širšem

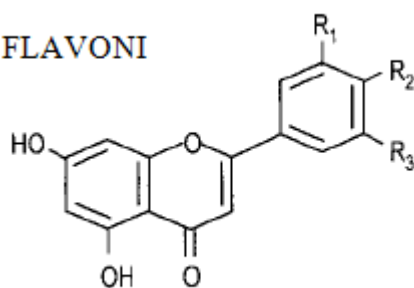
pomenu besede pa spadajo antocianidini, katehin in epikatehin, leukoantocianidini, halkoni in auron. Antocianidini imajo v piranovem obroču dve dvojni vezi. Katehin in epikatehin sta v rastlinah po navadi v obliki polimerov, ki jih imenujemo procianidini.

V rastlinah so flavonoidi v glikozilirani obliki. Sladkorna komponenta se največkrat veže prek fenolne skupine na C7 ali C3 in nastanejo *O*-glikozidi. Lahko pa nastanejo tudi *C*-glikozidi, če se sladkorna komponenta veže na enega od ogljikovih atomov, ponavadi na C6 ali C8. Sladkorna komponenta ponavadi vsebuje do tri komponente. Najpogostejši sladkorji so glukoza, galaktoza, ramnoza, aloza, arabinoza, ksiloza, apioza, glukoronska in galakturonska kislina (7).

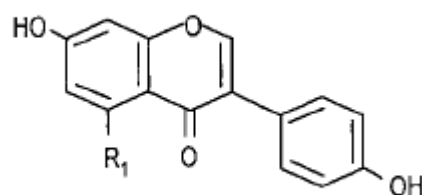
FLAVONOLI



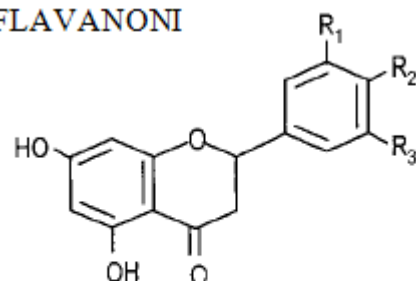
FLAVONI



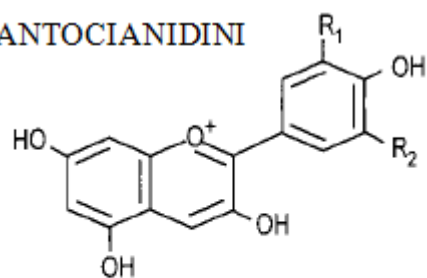
IZOFLAVONI



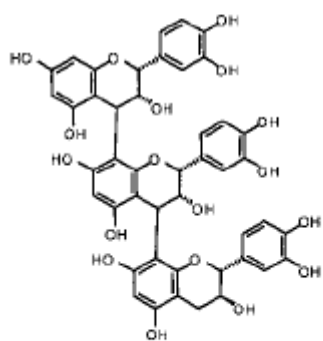
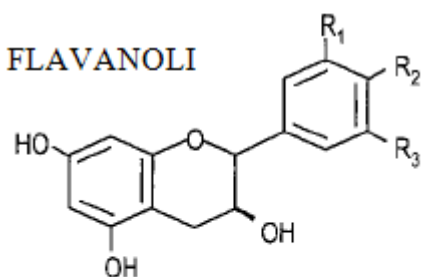
FLAVANONI



ANTOCIANIDINI



FLAVANOLI



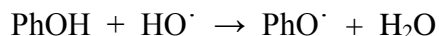
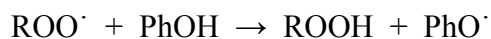
TRIMERNI PROCIANIDIN

Slika 7: Kemijske strukture flavonoidov (6).

Flavonoidi imajo antikoagulacijsko, hepatoprotektivno, antibakterijsko, spazmolitično, protitumorno in antioksidacijsko delovanje. Izoflavoni imajo estrogeno podobno delovanje, zato jih lahko uporabljamo za preprečevanje raka na prostati, osteoporoze in za lajšanje postmenopavzalnih težav. Pri vsem tem je potrebna določena previdnost, saj so nekateri rezultati pridobljeni na podlagi glikozidov, ki se v telesu hidrolizirajo s pomočjo črevesnih bakterij (5).

Delujejo v lipidnem in hidrofilnem okolju. Reakcije v vodnem okolju jim omogočajo fenolne skupine, interagirajo pa tudi s polarnimi glavami membranskih ostankov. Na membrane se adsorbirajo z vodikovimi vezmi, ki jih tvorijo s polarnimi glavami fosfolipidov in na ta način ustvarijo okolje, ki omejuje dostop oksidantov do lipidnega dvosloja (8).

Kot antioksidanti delujejo tako da radikal donirajo vodikov atom, nastali fenoksi radikal pa je relativno stabilen, tako da ne reagira naprej. (4)



Za njihovo delovanje so bistvenega pomena:

- *o*-hidroksi struktura B obroča, ki omogoča nastanek najbolj stabilnega fenoksilnega radikala po predaji vodikovega atoma
- v obroču C omogoča 2,3-dvojna vez v konjugiranem položaju s 4-okso skupino delokalizacijo elektrona iz B na C obroč
- kombinacija 3- in 5-OH skupin v obročih A in C z 2,3-dvojno vezjo omogoči delokalizacijo elektrona vzdolž celotne molekule in s tem večjo resonančno stabilizacijo

Ena izmed najbolj preučevanih lastnosti je njihova zmožnost obrambe pred oksidativnim stresom. Flavonoidi so namreč zaradi svojega redukcijskega potenciala do alkilnih peroksilnih radikalov idealni lovilec peroksilnih radikalov ter uspešni inhibitorji lipidne peroksidacije (4). Fenolne OH skupine pa jim omogočajo tvorbo kompleksov z ioni prehodnih kovin, ki potem

ne morejo vstopati v Fentonovo reakcijo, ki velja za glavni vir kisikovih zvrsti. Zaradi keliranja železovih ionov flavonoidi inhibirajo tudi od Fe^{2+} odvisno lipidno peroksidacijo (9).

Flavonoidi pa lahko intereagirajo tudi s sestavinami celice, kot so različni encimi, receptorji in transkripcijski faktorji, kar se kaže predvsem v regulaciji celičnega cikla, antiproliferativnem učinku in indukciji apoptoze (10).

1.2.2.2 Proantocianidini

Proantocianidini, poznani tudi kot kondenzirani tanini, so oligomeri, dimeri in polimeri flavan-3-olov povezani z vezjo med C4 in C8 ali C6. Delimo jih v procianidine, prodelfinidine in propelargonidine glede na to, kateri antocianidin nastane iz polimera pri segrevanju v kislem: cianidin, delfinidin ali pelargonidin.

Lastnosti so v veliki meri odvisne od stopnje polimerizacije (DP) molekul tanina in od narave osnovnih enot. Z večjim deležem polimerizacije se povečuje antioksidativna sposobnost, vendar le do določene stopnje polimerizacije (11).

Od večine ostalih polifenolov se razlikujejo zaradi njihovega polimernega značaja in po visoki molekularni masi, kar omejuje njihovo absorpcijo iz tankega črevesa, zato je njihovo delovanje omejeno na črevesje (6).

1.2.3 Viri antioksidantov

Pomemben vir antioksidantov so sadje in zelenjava. V zadnjem času pa se v organizem pogosto vnašajo tudi s prehranskimi dopolnili. Nekatere vrste antioksidantov in njihova nahajališča predstavljamo spodaj (12):

vitamin E: oreški, avokado, rastlinska olja, kaleča semena

vitamin C: citrusi, paprika, brokoli, črni ribez, kivi, mango, jagode

piknogenol: lubje iglavcev

resveratrol: lupine borovnic in črnega ribeza, rdeče vino, rdeče grozdje

likopen: paradižnik, melona, grenivka

flavonoidi: citrusi, čajni lističi, čebula, jabolka, rdeče vino, čokolada

antocianin: jajčevci, grozdje in jagodičje

β-karoten: korenje, peteršilj, bučke, mango, špinača

katehini: čajni lističi, rdeče vino, čokolada

indoli: brokoli, cvetača, zelje

žveplove spojine: česen, čebula, čemaž

lutein in zeaksantin: koruza, zelena solata, špinača

izoflavonoidi: soja, fižol, grah, čičerka

polifenoli: timijan in origano

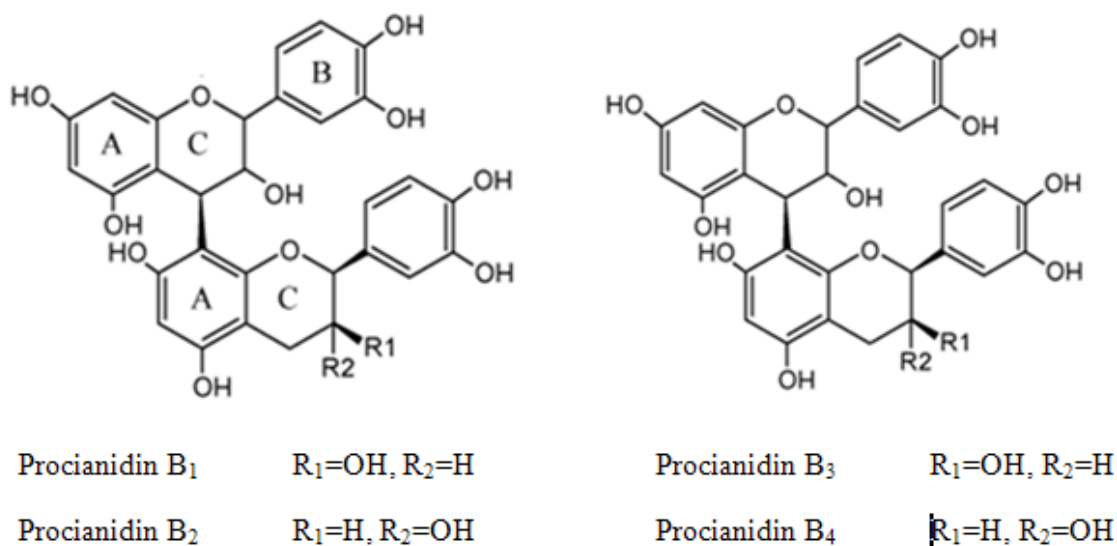
koencim Q: tkiva in membrane

1.3 PIKNOGENOL

Piknogenol je naraven produkt, pridobljen iz lubja evropskega morskega bora (*Pinus maritima* Mill. s sinonimom *Pinus pinaster*) in je izredno močan antioksidant. V izvlečku so flavonoidi, predvsem proantocianidinskega tipa. Podobne učinkovine je najti tudi v grozdnih pečkih, le da ne v takšnih količinah in ne tako raznolikih. Celotna zmes piknogenola je sestavljena iz približno 50 učinkovin, ki delujejo antioksidacijsko. Piknogenol ima nekaj desetkrat močnejši antioksidacijski učinek kot vitamina E in C. Študije kažejo, da se piknogenol po peroralnem vnosu dobro absorbira iz prebavil in se že po dvajsetih minutah razporedi po organizmu. Piknogenol predvsem preprečuje prezgodnji propad celic in s tem staranje organizma, preventivno deluje proti rakavim obolenjem in izboljšuje delovanje imunskega sistema. Blagodejno učinkuje na krvožilni sistem, uporabljajo pa ga lahko tudi diabetiki. Blaži tudi simptome predmenstrualnega sindroma, upočasnjuje napredovanje paradontopatij in pospeši regeneracijo manjših površinskih poškodb kože (12).

Glavne fenolne spojine v skorji bora so procianidini (Slika 8), ki so najpogostejša podskupina proantocianidinov. Kateholi, fenolne kisline in monomerni flavonoli so v skorji prisotni v manjši količini (10).

Kot pomemben alternativni vir za pridobivanje antioksidantov bi lahko služil *Pinus radiata* D. Don, ki raste v ZDA in Kanadi in vsebuje celo večje količine procianidinov, ki so tudi učinkovitejši kot v obmorskem boru (*P. Pinaster*). Procianidine, ki so poleg ligninov najbolj razširjeni v rastlinah, pa lahko najdemo v različnih vrstah sadja in zelenjave (11).

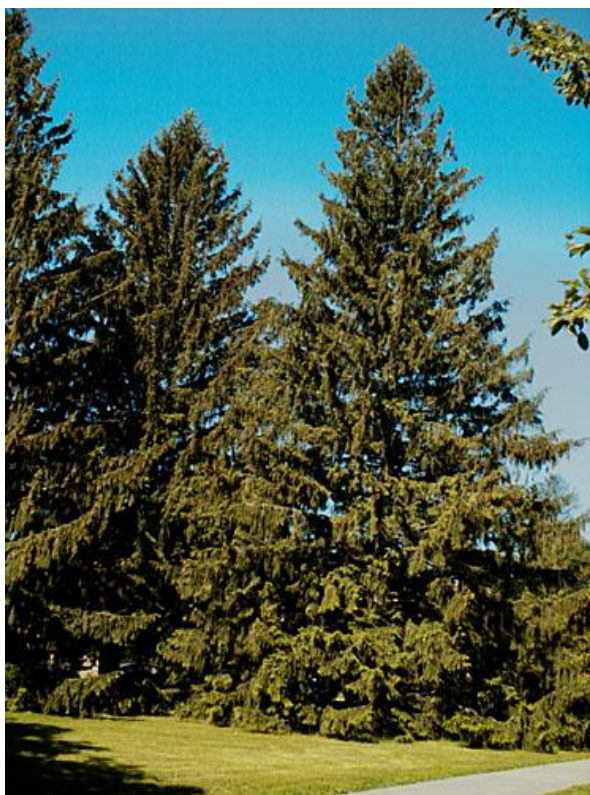


Slika 8: Strukture dimernih procianidinov.

1.4 NAVADNA SMREKA (*Picea abies* (L.) Karst.)

Smreka (*Picea abies*) je v slovenskem prostoru verjetno najpogostejši iglavec, ki ga poleg bora, jelke, macesna in cedra uvrščamo v družino borovk (Pinaceae). Navadna smreka raste po iglastih in mešanih gozdovih, lahko pa oblikuje tudi čiste sestoje, od nižine pa vse do

zgornje gozdne meje. Je vitko, do 50 m visoko, enodomno drevo z rdečkasto rjavim, luskasto razpokanim lubjem in z veliko stožčasto krošnjo. Veje so poraščene s temno zelenimi koničastimi iglicami, ki so spiralasto razmeščene na dolgih poganjkih. Cvetovi so enospolni in so v socvetjih. Spomladi se razvijejo na istem drevesu ženski in moški cvetovi. Moške cvetove tvorijo številni prašniki, ki so spiralasto nanizani na skupni osi. Ženski cvet sestavljata krovna in plodna luska. Ženski cvetovi so združeni v valjaste olesenele in viseče storže. Oploditev poteče v istem letu kot oprашitev (13, 14).



Slika 9: Navadna smreka (*Picea abies* (L.) Karst.).

Iz skorje vseh iglavcev pridobivamo terpentini in iz njega destiliramo eterična olja, ki se med seboj razlikujejo po sestavi in učinku.



Slika 10: Skorja navadne smreke.

Terpentin (*Terebinthiae balsamum*) je sestavljen iz eteričnega olja in smole. Vsebuje tudi vodo, rastlinske delce, žuželke in različne minerale. Dobimo ga tako, da v skorjo dreves naredimo zarezo v obliki črke »V« in poberemo iztekajočo rumenkasto in močno dišečo smolo, ki se na zraku hitro strdi. Sledi čiščenje terpentina, nato pa destilacija z vodno paro, s katero dobimo približno 25 % eteričnega olja. Ostanek je trdna smola, imenovana kolofonij, ki je sestavljena pretežno iz diterpenskih smolnih kislin in jo uporabljamo pri izdelavi sintetičnih lakov, kot depilacijsko sredstvo, v farmacevtski industriji pa za izdelavo obližev in mazil. Terpentin ima ekspektorantno delovanje, uporablja se za izboljšanje bronhialne sekrecije in zunanje kot rubefacient. Terpentinovo eterično olje (*Terebinthiae aetheroleum*) sestavljajo pretežno monoterpenski ogljikovodiki: α -pinen, β -pinen, kamfen, β -felandren in Δ^3 -karen (5).

Eterično olje smreke lahko pridobivamo tudi z destilacijo z vodo iz svežih iglic. Terpentinovo eterično olje in eterično olje smreke se razlikujeta le v postopku pridobivanja, medtem ko je njuno delovanje enako. Zaradi dekongestivnega, ekspektorantnega, antiseptičnega, protivnetnega in rubefacientnega delovanja ju uporabljamo v primeru prehlada, bronhitisa, revmatoidnega artritisa, nevralgičnih obolenjih in za zdravljenje vnetja in razjed

ustne votline. Zdravilni učinki so predvsem posledica vsebnosti bornilacetata, limonena, kamfena in α -pinena (5).

V ljudski medicini uporabljajo predvsem smrekove vršičke, iz katerih pripravljajo sirup ali čaj. Kot sveže poganjke nekaterih iglavcev uporabljamo tudi sveže brste smreke v obliki poparka pri prehladih, kašlju in gripoznih stanjih, kljub temu da se del vitamina C uniči v infuzu, se uporablja pri krvavenju dlesni in za čiščenje krvi ter pri revmatičnih težavah. Zunanje se uporabljajo vršički kot dodatek kopelim, ker pospešujejo celjenje ran, pospešujejo prekrvitev in dajejo prijeten vonj (14).

Vsebnost polifenolov se nekoliko razlikuje med rodovi in vrstami iglavcev, hidrofilni izvlečki pa v osnovi vsebujejo glikozidne in proste fenolne kisline, stilbene, lignane, flavonoide in proantocianidine.

Med flavonoidnimi učinkovinami se najpogosteje pojavljajo flavonoli, katerih aglikoni so največkrat kemferol, kvercetin, izoramnetin, laricitrin, miricetin in sirengitin. Za vrste iz rodu *Picea* so značilne strukture z manjšo stopnjo oksidacije (kemferol in kvercetin), medtem ko vsebujejo jelke več bolj oksidiranih aglikonov (miricetin, laricitin). Našteti aglikoni so v poganjkih in iglicah predvsem v obliki 3-*O*-glukozidov, 3-*O*-rutinozidov in 3-*O*-(6"-acetil-glukozidov). V analiziranih ekstraktih poganjkov in mladih iglic nekaterih borov pa so našli le 3-*O*-glukozide kemferola in izoramnetina, 7-*O*-glukozid kemferola ter mono- in dikumaril glukozide kemferola.

Analiza ekstraktov poganjkov in mladih iglic smreke, *Picea abies*, je dala naslednje rezultate vsebnosti flavonoidov: kemferol 3-glukozid > kvercetin 3-glukozid > kemferol 7-glukozid > kemferol 3-(6"-acetil-glukozidov > taksifolin > izoramnetin acetil-glukozid > kemferol 3-rutinozid (15).

Narejena je bila raziskava, ki kaže podrobnejšo sliko spojin prisotnih v skorji korenine. Z reverzno fazno HPLC in kolonsko kromatografijo so raziskovali predvsem fenolne in terpenoidne komponente skorje korenine navadne smreke. Določili so devet monoarilnih komponent, tri stilbenske glikozide, deset lignanskih, dve flavonoidni in pet katehinskih in proantocianidinskih frakcij. Obstaja torej še en vir iz katerega bi lahko izolirali polifenole (16).

Na osnovi plinske kromatografije in masne spektroskopije so v eni prejšnjih raziskav identificirali hlapne spojine, ki jih predstavljamo v Tabeli III.

Tabela III: Hlapne spojine v skorji navadne smreke (17).

triciklen	mirtenol	oksid. monoterpen	borneol
α - β -pinen	α - β -felendren	seskviterpen	β -kariofilen
β -fenhen	α - γ -terpinen	kafra	verbenon
fenhon	terpinolen	pinokamfon	longifolen
fenhilalkohol	4-terpineol	izopinokamfon	<i>L</i> -karvon
kamfen	α -terpinol	pinokarvon	kuminilaldehid
kamfolenaldehid	α -terpenilacetat	timilmetileter	kuminilalkohol
sabinen	1,8-cineol	<i>trans</i> -pinokarveol	limonen
Δ^3 -karen	<i>p</i> -cimen	bornilacetat	α - γ -muurolen
mircen	8-hidroksi- <i>p</i> -cimen	izoborneol	γ - δ -kadinen
mirtenal	α - β -pinenoksid	<i>trans</i> -verbenol	<i>endo</i> -1,3-dimetil-2,9-dioksabiciklo[3.3.1]nonan ¹

¹ spojina je specifična za smreko, ki jo je napadel hrošč *Xyloterus lineatus* Oliv. (Coleoptera Scolytidae)

2 NAMEN DELA

Namen tega dela je izboljšati metodo za izolacijo polifenolnih spojin iz skorje navadne smreke. Skorja navadne smreke je namreč zelo dostopen material, po vsebnosti pa je tudi primerljiv s skorjo obmorskega bora, zato bi to lahko bil pomemben alternativni vir piknogenolu, zato bomo antioksidativno delovanje in vsebnost polifenolnih spojin primerjali s piknogenolom.

Ekstrakt bomo pripravili po patentnem postopku za piknogenol, tega pa potem poskušali izboljšati z zamenjavo kloroforma z učinkovitejšim in varnejšim topilom ter optimizirali volumen novega topila.

Celokupno vsebnost polifenolnih spojin bomo določali s Folin-Ciocalteau-jevo metodo, antioksidativno delovanje pa z DPPH metodo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Uporabljali smo skorjo navadne smreke, ki je bila nabrana decembra 2007 v okolici Kočevske Reke. Skorja je bila ročno lupljena in dva dni sušena v kurilnici pri temperaturi približno 25°C.

3.2 APARATURE IN OPREMA

- analizna tehtnica – KERN ALS 120-4, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija
- električni mlinček, Waring blender, model HGBTWT, Waring, Torrington CT, ZDA
- električni kuhalnik, Corona, Kranj, Slovenija
- magnetno mešalo ROTAMIX 550 MM, Tehnica, Železniki, Slovenija
- rotavapor – Büchi Rotavapor R-200, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Švica
- rotavapor kopel – Büchi Heating Bath B-490, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Švica
- rotavapor črpalka in nadzor – Büchi Vacuum Controller V-800, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Švica
- tehtnica Mettler PC 2000, Mettler-Toledo, Inc., Columbus OH, ZDA
- UV/VIS Spektrometer Lambda 20, Perkin Elmer, Waltham MA, ZDA

3.3 KEMIKALIJE

- **2,2-difenil-1-pikrilhidrazil**, 43180, Fluka, Buchs, Švica
- **brezvodni natrijev sulfat**, 31481, Riedel de Haën, Seelze bei Hannover, Nemčija
- **diklorometan**, 32222, Riedel de Haën, Seelze bei Hannover, Nemčija
- **dietil eter**, 32203, Riedel de Haën, Seelze bei Hannover, Nemčija
- **diizopropil eter**, 100867, Merck, Darmstadt, Nemčija

- **etilacetat**, 33211, Riedel de Haën, Seelze bei Hannover, Nemčija
- **Folin-Ciocalteu-jev fenolni reagent**, Fluka, 47641, Buchs, Švica
- **heksan**, 32293, Riedel de Haën, Seelze bei Hannover, Nemčija
- **heptan**, 104366, Merck, Darmstadt, Nemčija
- **metanol**, 32213, Riedel de Haën, Seelze bei Hannover, Nemčija
- **natrijev klorid**, 31434, Riedel de Haën, Seelze bei Hannover, Nemčija
- **pentan**, 32288, Riedel de Haën, Seelze bei Hannover, Nemčija
- **petroleter 40-60°C**, 32299, Riedel de Haën, Seelze bei Hannover, Nemčija
- **pirogallol**, 254002, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija
- **Pycnogenol®**, F0400, Biolandes, Le Sen, Francija
- **triklorometan (kloroform)**, 32211, Riedel de Haën, Seelze bei Hannover, Nemčija

3.4 METODE

3.4.1 Postopek izolacije polifenolnih spojin iz skorje navadne smreke

Polifenolne spojine smo ekstrahirali z maceracijo, pri kateri smo rastlinski material najprej zdrobili do ustrezne stopnje razdrobljenosti, dobro premešali s predpisanim topilom in pustili stati ustrezen čas.

Pogoje ekstrakcije izberemo tako, da se iz preiskovane rastlinske snovi izloči čim večja količina spojin na kar najhitrejši način, s čim manj stroški. Pomembno je da dosežemo čim hitrejšo omočitev droge in boljše difundiranje v celice. Na ekstrakcijo vpliva tudi temperatura pri kateri le-to izvajamo, viskoznost topila namreč z naraščanjem temperature pada, difuzijski koeficient je z njo v premosorazmerju, topnost spojin pa običajno s temperaturo narašča.

Ekstrakt iz smrekove skorje smo najprej pridobili po patentnem postopku za piknogenol, po katerem pridobivajo polifenolne spojine iz skorje obmorskega bora (18):

100 kg skorje obmorskega bora uprašimo in ga ekstrahiramo s tolikšno količino vode, da dobimo skupaj z uprašeno rastlinsko snovjo 250 litrov. Tako dobljeno zmes ohladimo na 20°C

in jo filtriramo. Filtratu dodamo toliko NaCl, da pride do nasičenja (namesto NaCl lahko uporabimo 20% (m/v) amonijev sulfat). Nastalo oborino odstranimo s filtracijo. Filtrat trikrat ekstrahiramo z etilacetatom. Volumen etilacetata je vsakič enak 1/10 volumna vodne faze. Zbranim etilacetatnim frakcijam dodamo kot sušilno sredstvo brezvodni Na₂SO₄. Etilacetat odparimo pod znižanim tlakom do 1/5 njegovega volumna in mu nato med mešanjem dodamo trikrat večji volumen kloroforma. Pri tem se oborijo proantocianidini, ki jih dobimo s filtracijo. Proantocianidine po potrebi očistimo s ponovnim raztapljanjem v etilacetatu, ki mu sledi ponovno obarvanje v kloroformu. Postopek zaključimo s spiranjem proantocianidinov s kloroformom in sušenjem v sušilniku pod znižanim tlakom. Temperatura komore naj ne presega 50°C.

V naslednji stopnji pa smo preizkušali topila, ki bi v tem postopku nadomestila kloroform.

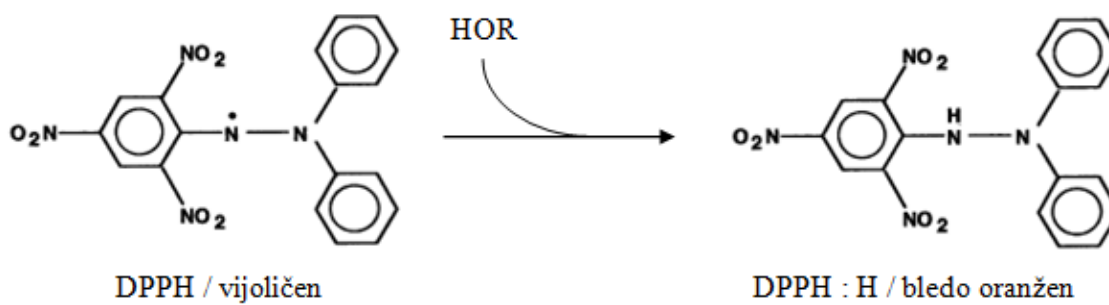
3.4.2 Določanje vsebnosti polifenolnih spojin s Folin-Ciocalteu-jevo metodo (19)

Folin-Ciocalteu-jev reagent je raztopina polimernega ionskega kompleksa iz fosfomolibdenskih in fosfovolframovih heteropolnih kislin, ki oksidira fenolate. Heteropolne kisline se reducirajo in zato nastane moder kompleks. Pri metodi merimo absorbanco raztopine, ki se obarva zaradi reakcije med fenolnimi spojinami in Folin-Ciocalteu-jevim reagentom. Ker so fenolati prisotni le v bazičnem mediju, reagent in nastali produkti pa so v takih pogojih nestabilni, izvajamo reakcijo pri šibko bazičnih pogojih in z visoko koncentracijo reagenta. Raztopini vzorca dodamo Folin-Ciocalteu-jev reagent in po treh minutah še raztopino natrijevega karbonata, dobro premešamo in po eni uri izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 765 nm. Vsebnost izrazimo glede na standard, v našem primeru je to pirogalol. Pri interpretaciji rezultatov moramo upoštevati da različne fenolne spojine različno reagirajo s Folin-Ciocalteu-jevim reagentom ter tudi interferenco z ostalimi spojinami, kot so sladkorji ali askorbinska kislina prisotnimi v ekstraktu, saj FC reagent reagira z vsemi reducirajočimi spojinami. Torej ni nujno da je antioksidativna aktivnost

ekstrakta v povezavi z vsebnostjo polifenolnih spojin, zato je pomembno določati tako eno kot drugo, kadar ocenjujemo antioksidativni potencial določenega ekstrakta.

3.4.3 Določanje antioksidativne aktivnosti polifenolnih spojin z DPPH metodo (20)

Molekula 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH) je v obliki stabilnega radikala. Prosti elektron je delokaliziran po celotni molekuli, kar onemogoča dimerizacijo le-te, daje pa ji tudi intenzivno vijolično barvo z visokim absorpcijskim maksimumom pri valovni dolžini okoli 520 nm. Ko raztopini DPPH dodamo antioksidant, ki je donor vodikovega atoma, pride do nastanka reducirane oblike molekule in zaradi tega do razbarvanja raztopine. Reakcijo zaznamo s padcem absorbance. Pri reakciji se DPPH reducira do hidrazina, iz molekule antioksidanta pa nastane nov radikal, ki v naslednji stopnji zreagira z novo molekulo DPPH.



Slika 11: Reakcija DPPH radikala z antioksidantom.

Stehiometrija reakcije je odvisna od števila DPPH molekul, ki jih je reducirala ena molekula antioksidanta, to je od števila skupin na molekuli, ki so donorji vodikovih atomov.

Rezultate smo dobili iz razmerja absorbanc. Antioksidativno aktivnost smo določili glede na piknogenol, tako da smo piknogenolu pripisali aktivnost 1, ekstraktom pa jo določili iz razmerja absorbanc.

3.4.4 Oboritev proantocianidinov s topili, ki bi lahko nadomestila kloroform

Na osnovi vrednosti dielektričnih konstant (Tabela IV) smo izbrali topila, ki smo jih preizkusili in ki bi lahko bila nadomestek kloroforma pri obarjanju proantocianidinov (21, 22, 23).

Tabela IV: Fizikalne lastnosti topil.

Topilo	Vrelišče / °C	Dielektrična konstanta
diklorometan	39	8,93
kloroform	61	4,81
dietileter	35	4,34
heksan	69	2,02
heptan	98,4	1,92
pentan	36	1,84
petroleter	30-60	/
izopropileter	68-69	/

Topilo, ki ga dodamo etilacetatnemu ekstraktu mora zmanjšati polarnost topila, zato da pride do obarjanja v etilacetatu dobro topnih polifenolov (oligomernih procianidinov, flavonoidov...).

3.5 EKSPERIMENTALNO DELO

3.5.1 Priprava ekstrakta iz skorje navadne smreke po patentnem postopku za piknogenol

Zatehtali smo 100 g zdrobljene skorje in jo prelili s 750 mL vrele vode. Segrevali smo na električnem grelniku približno 15 min in nato ohladili. Izvedli smo filtracijo pod znižanim tlakom in nato dodali toliko NaCl, da smo dobili nasičeno raztopino. Raztopino smo oddekantirali in izvedli ekstrakcijo z etilacetatom. Uporabili smo trikrat po 100 mL. Dobljenemu ekstraktu smo dodali sušilno sredstvo – brezvodni natrijev sulfat (50 g) in pustili na mešalu čez noč. Naslednji dan smo zmes filtrirali in odparili topilo pri znižanem tlaku in 40°C, tako da smo dobili približno 30 mL raztopine. Tej raztopini smo dodali 90 mL kloroforma. Nastala je oborina. Zmes smo pustili v hladilniku (+4°C) čez noč. Nato smo raztopino filtrirali pri znižanem tlaku, ostanek na filtru trikrat sprali z 10 mL kloroforma in sušili pri znižanem tlaku in 40°C do konstantne mase, kar je trajalo približno eno uro. Iz dobljenega suhega ekstrakta smo pripravili vzorce za FC in DPPH reakcijo.

3.5.1.1 Določanje vsebnosti polifenolnih spojin s Folin-Ciocalteau-jevo metodo

V poskusih smo spektrofotometrično določali vsebnost polifenolnih spojin. Iz absorbanc za pirogalol in za piknogenol smo izračunali koncentracijo polifenolov v mg/mL v piknogenolu, izraženih kot pirogalol, to koncentracijo smo nato uporabili za izračun koncentracije polifenolov izraženih s pirogalolom v našem ekstraktu.

Reagenti:

- Folin-Ciocalteau-jev reagent
- 20 % raztopina natrijevega karbonata: v čašo smo zatehtali 5 g natrijevega karbonata, ga raztopili v 20 mL vode in segrevali na električnem kuhalniku do vrenja. Po

ohladitvi smo dodali nekaj kristalov natrijevega karbonata, filtrirali v 25 mL merilno bučko in dopolnili do oznake.

Osnovna raztopina pirogalola

- V 50 mL merilno bučko smo zatehtali 3 mg pirogalola in dopolnili z vodo do oznake. Raztopino smo desetkratno redčili. 10 mL te raztopine smo prenesli v 100 mL merilno bučko in dopolnili do oznake.

Osnovna raztopina ekstrakta

- 3 mg ekstrakta smo zatehtali v 50 mL merilno bučko in dopolnili z vodo do oznake. Raztopino smo desetkratno redčili.

Osnovna raztopina piknogenola

- 3 mg piknogenola smo zatehtali v 50 mL merilno bučko in dopolnili z vodo do oznake. Raztopino smo desetkratno redčili.

Vzorčne raztopine:

- 8,5 mL osnovne raztopine smo dodali 0,5 mL Folin-Ciocalteau-jevega reagenta in po 3 minutah 1 mL 20 % raztopine natrijevega karbonata. Absorbance raztopin smo izmerili 60 minut po dodatku obeh reagentov pri valovni dolžini 765 nm.

Slepi vzorec

- 8,5 ml vode smo dodali 0,5 mL Folin-Ciocalteau-jevega reagenta in po 3 minutah 1 mL 20 % raztopine natrijevega karbonata.

Iz absorbanc za pirogalol in za piknogenol smo izračunali koncentracijo polifenolov v mg/mL v piknogenolu izraženih kot pirogalol, to koncentracijo smo nato uporabili za izračun koncentracije polifenolov izraženih s pirogalolom v našem ekstraktu.

$$\frac{A(\text{pirogalol})}{A(\text{piknogenol})} = \frac{c(\text{pirogalol})}{c(\text{piknogenol})} \rightarrow c(\text{piknogenol}) = \frac{A(\text{piknogenol})}{A(\text{pirogalol})} \times c(\text{pirogalol})$$

$$\frac{A(\text{ekstrakt})}{A(\text{piknogenol})} = \frac{c(\text{ekstrakt})}{c(\text{piknogenol})} \rightarrow c(\text{ekstrakt}) = \frac{A(\text{ekstrakt})}{A(\text{piknogenol})} \times c(\text{piknogenol})$$

3.5.1.2 Določanje antioksidativne aktivnosti polifenolnih spojin z DPPH metodo

Reagent:

- DPPH reagent smo pripravili z raztapljanjem 3,9 mg DPPH v metanolu v 100 mL merilni bučki. Ker raztopina na svetlobi ni stabilna smo imeli bučko zavito v alu folijo in shranjeno v hladilniku. Raztopino smo za vsak poskus sveže pripravili.

Osnovna raztopina pirogalola:

- Pirogalol reagira z DPPH in ga pri tem reducira do difenilpikrilhidrazina, kar lahko zaznamo kot padec absorbance pri valovni dolžini 515 nm.
- Raztopino pirogalola smo pripravili tako, da smo v 50 mL merilno bučko zatehtali 3 mg pirogalola in dopolnili z metanolom do oznake. Tako pripravljeno raztopino smo redčili petdesetkrat: 2 mL smo prenesli v 100 mL merilno bučko in z metanolom dopolnili do oznake.

Osnovna raztopina piknogenola:

- V 50 mL merilno bučko smo zatehtali 3 mg piknogenola in dopolnili z metanolom do oznake. Raztopino smo desetkrat redčili.

Osnovna raztopina ekstrakta:

- V 50 mL merilno bučko smo zatehtali 3 mg ekstrakta in dopolnili z metanolom. Raztopino smo desetkrat redčili.

Vzorčne raztopine:

- 12,5 mL osnovne raztopine smo dodali po 12,5 mL DPPH reagenta.
- Absorbanco smo merili po eni uri pri 515 nm.

Iz izmerjenih absorbanc smo izračunali aktivnost polifenolnih spojin v vzorcih piknogenola in našega ekstrakta. Padec absorbance smo izračunali tako da smo od absorbance slepe raztopine odšteli absorbance vzorčnih raztopin. Iz padcev absorbanc za pirogalol in piknogenol pa smo izračunali aktivnost polifenolnih spojin v piknogenolu izraženih s pirogalolom, iz te pa aktivnost polifenolnih spojin v našem ekstraktu. Rezultate smo dobili iz razmerja izmerjenih absorbanc:

$$\frac{A(\text{pirogolol})}{A(\text{piknogenol})} = \frac{\text{aktivnost}(\text{pirogolol})}{\text{aktivnost}(\text{piknogenol})}$$

$$\text{aktivnost}(\text{piknogenol}) = \frac{A(\text{piknogenol})}{A(\text{pirogolol})} \times \text{aktivnost}(\text{pirogolol})$$

3.5.2 Optimizacija izolacije polifenolnih spojin iz skorje navadne smreke

3.5.2.1 Priprava ekstrakta iz skorje navadne smreke s potencialno nadomestnimi topili

Prve stopnje priprave suhega ekstrakta iz skorje navadne smreke so bile enake kot v patentnem postopku. Edina razlika, ki smo jo uvedli je bilo topilo s katerim smo oborili etilacetatni ekstrakt. V 8 epruvt z debelimi stenami smo odmerili po 2 mL etilacetatnega ekstrakta in dodali po 6 mL izbranih topil. Zmes smo centrifugirali 5 minut pri 4000 obr.min⁻¹ in nato previdno odlili bistro raztopino. Dobljene oborine smo sušili v sušilniku pri 50 – 60 °C do konstantne mase. S Folin-Ciocalteau-jevo metodo smo določali vsebnost in z DPPH učinkovitost polifenolnih spojin v oborini. Izmerjene absorbance so nam služile kot orientacija pri izbiri nadomestnega topila.

3.5.2.2 Priprava ekstraktov z izbranimi topili

Ekstrakte smo pripravili s štirimi topili, ki so se izkazala za najboljša izmed uporabljenih topil. Izvedli smo tudi Folin-Ciocalteau-jevo reakcijo in določili vsebnost ter DPPH reakcijo, da smo določili aktivnost.

3.5.2.3 Optimizacija volumna pentana za obarjanje antioksidantov

Zatehtali smo 430 g zmlete skorje in jo prelili s 1600 mL vrele vode. Segrevali smo približno 15 minut, nato pa ohladili in filtrirali pri znižanem tlaku. Dobili smo približno 600 mL vodnega ekstrakta. Izvedli smo ekstrakcijo s trikrat po 200 mL etilacetata. Dodali smo sušilno sredstvo in nato naslednji dan izvedli filtracijo pod znižanim tlakom. Topilo smo odparili pri znižanem tlaku in 40°C tako, da smo dobili nasičeno raztopino. Po 10 mL dobljenega ekstrakta smo nalili v 6 erlenmajeric in dodali v prvo 5 mL, v drugo 10 mL, v tretjo 15 mL, v četrto 20 mL, v peto 25 mL in v šesto erlenmajericico 30 mL pentana. Tako pripravljene raztopine smo pustili v hladilniku do naslednjega dne in jih nato filtrirali pod znižanim tlakom. Dobljene oborine smo sušili pri znižanem tlaku in 40°C do konstantne mase. In jim določili vsebnost polifenolnih spojin in njihovo antioksidativno aktivnost.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PRIPRAVA SUHEGA EKSTRAKTA IZ SKORJE NAVADNE SMREKE

Rezultati poskusov, preizkušanja različnih topil za oboritev proantocianidinov iz skorje navadne smreke so prikazani v tabelah.

Tabela V: Dobljene mase oborin pri obarjanju z različnimi topili.

topilo	masa oborine [mg]
dietileter	22,0
izopropileter	22,1
pentan	57,3
heksan	64,2
heptan	61,8
petroleter	33,2
diklorometan	2,3
kloroform	49,1

Tabela VI: Rezultati Folin-Ciocalteu-jevih reakcij za določitev vsebnosti polifenolnih spojin v oborinah dobljenih s preiskušanimi topili.

vzorec	absorbanca	vsebnost polifenolov v suhem ekstraktu izraženih kot pirogalol [%]	razmerje vsebnosti vzorec/piknogenol
oborina (dietileter)	0,322	41,6	1,21
oborina (izopropileter)	0,380	49,0	1,43
oborina (pentan)	0,412	53,2	1,55
oborina (heksan)	0,415	53,6	1,56
oborina (heptan)	0,329	42,5	1,24
oborina (petroleter)	0,408	52,7	1,53
oborina (diklorometan)	0,408	52,7	1,53
oborina (kloroform)	0,439	56,7	1,65
piknogenol	0,266	34,0	1,00
pirogolol	0,155	/	/

Tabela VII: Rezultati DPPH reakcij za določitev razmerij antioksidativnih aktivnosti oborin dobljenih z različnimi topili.

vzorec	razlika absorbanc	razmerje antioksidativnih aktivnosti vzorec/piroga lol	razmerje antioksidativnih aktivnosti vzorec/piknogenol
oborina (dietileter)	0,111	0,53	0,63
oborina (izopropileter)	0,093	0,45	0,53
oborina (pentan)	0,096	0,46	0,55
oborina (heksan)	0,103	0,50	0,59
oborina (heptan)	0,122	0,59	0,69
oborina (petroleter)	0,099	0,48	0,56
oborina (diklorometan)	0,149	0,72	0,85
oborina (kloroform)	0,096	0,46	0,55
piknogenol	0,176	0,85	1,00
pirogolol	0,332	1,00	/

Rezultati DPPH reakcij nam kažejo, da imajo naši ekstrakti in piknogenol zelo podobno antioksidativno delovanje ter se tudi po vsebnosti antioksidantov ne razlikujejo bistveno. Glede na najmočnejšo antioksidativno jakost bi pričakovali tudi največjo vsebnost polifenolov, a rezultati kažejo da temu ni tako. Največji delež polifenolov vsebuje ekstrakt, ki smo ga pripravili po patentnem postopku za piknogenol. Med oborjenimi polifenolnimi spojinami pa verjetno niso vse antioksidativno aktivne, ali pa so šibkejši antioksidanti. Poleg

vsebnosti polifenolov in njihove antioksidativne aktivnosti smo pri izbiri topila upoštevali tudi same lastnosti oborine, ki je nastala. Za topilo, ki bi ga lahko uporabljali v postopku pridobivanja antioksidantov iz smrekovega lubja smo izbrali pentan, ker je bil presek vseh lastnosti pri tem topilu najbolj ugoden. Oborina, ki je nastala je bila najbolj ugodna za nadaljni tehnološki proces, bila je zelo čista ter enostavno in hitro smo jo posušili. Same lastnosti pentana tudi ugodno vplivajo na postopek izolacije. Temperatura vrelišča je nizka in precej različna od temperature vrelišča etilacetata, kar je pomembno za uspešnost odparevanja topila v postopku pridobivanja ekstrakta. Temperatura vrelišča pentana je 32°C, etilacetata pa 70°C. Je tudi brez toksičnih primesi in med možnimi topili tudi cenovno najbolj ugoden.

4.2 OPTIMIZACIJA VOLUMNA PENTANA ZA OBARJANJE ANTI-OKSIDANTOV

Optimizirali smo količino potrebnega topila za oboritev proantocianidinov. Rezultati so prikazani v tabelah.

Tabela VIII: Dobljene mase oborin pri obarjanju z različnimi volumni pentana.

V (pentan) [mL]	masa oborine [mg]
5,0	101,0
10,0	77,0
15,0	102,5
20,0	69,4
25,0	75,1
30,0	124,5

Tabela IXI: Rezultati Folin-Ciocalteu-jevih reakcij za določitev vsebnosti polifenolnih spojin v oborinah dobljenih z različnimi volumni pentana .

V (pentan) [mL] /vzorec	absorbanca	vsebnost polifenolov izraženih kot pirogalol [%]	razmerje vsebnosti polifenolov vzorec/piknogenol
5,0	0,346	53,0	1,14
10,0	0,388	59,4	1,28
15,0	0,588	90,0	1,93
20,0	0,398	60,9	1,31
25,0	0,402	61,5	1,32
30,0	0,358	54,8	1,18
piknogenol	0,304	1,00	1,00
pirogalol	0,196	46,5	/

Tabela X: Rezultati DPPH reakcij za določitev antioksidativne aktivnosti polifenolnih spojin oborin dobljenih z različnimi volumni pentana.

V (pentan) [mL] / vzorec	A (DPPH) - A	aktivnost polifenolov glede na pirogalol	razmerje aktivnosti polifenolov vzorec/piknogenol
5,0	0,121	2,27	0,766
10,0	0,124	2,32	0,785
15,0	0,122	2,28	0,772
20,0	0,120	2,25	0,759
25,0	0,125	2,34	0,791
30,0	0,124	2,32	0,785
piknogenol	0,158	/	/
pirogalol	0,178	2,96	1,000

Iz tabele je razvidno, da je antioksidativna aktivnost produktov pridobljenih z različnimi količinami pentana, skoraj enaka. Največjo količino polifenolov smo sicer določili v primeru, ko smo etilacetatnemu ekstraktu dodali 1,5-kratno količino pentana, vendar je bila nastala oborina s tehnološkega vidika najmanj ugodna. V primeru, ko smo ekstraktu dodali trikratno količino topila je nastala oborina, ki je bila med vsemi najbolj voluminozna, zlahka smo jo filtrirali, hitro se je posušila, medtem ko je v ostalih primerih nastala oborina z majhnimi delci, ki so pronicali skozi filter papir. Glede na to, da se vsebnost in učinkovitost med nastalimi

oborinami bistveno ne razlikujejo, so bile glavni kriterij pri izbiri količine volumna lastnosti oborine, ki morajo omogočiti učinkovit tehnološki postopek.

Masa suhega ekstrakta ($m(\text{CHCl}_3)$), ki smo ga dobili iz 100 g zmlete skorje po patentnem postopku za piknogenol (20) je bila 270 mg. V poskusu, ko smo etilacetatni ekstrakt oborili s pentanom, je bila masa suhega ekstrakta ($m(\text{C}_5\text{H}_{12})$) 770 mg, kar je kar 2,8-krat več kot, če etilacetatni ekstrakt oborimo s kloroformom. Razlika v obeh postopkih izdelave suhega ekstrakta je bila le v topilu s katerim smo oborili proantocianidine. Topilo za ekstrakcijo je bila v obeh primerih voda, ki je kot polarno topilo primerna, saj z njo ne ekstrahiramo zelo nepolarnih snovi (smola, lipidi in voski) in visokopolimernih procianidinov (čreslovine). Ekstrakcijo izvajamo pri visoki temperaturi (100°C) že zaradi same konsistenca rastlinskega materiala, poleg tega pa se s segrevanjem znebimo hlapnih spojin, ki so v skorji smreke prisotne kot sestavine eteričnega olja. Z dodatkom kloroforma oz. pentana oborimo spojine, ki so sicer dovolj nepolarne, da se iz vode ekstrahirajo v etilacetat, a še premalo, da bi bile topne v kloroformu oz. pentanu. Take spojine so na primer oligomerni procianidini.

Tabela XII: Vsebnost polifenolov in njihova antioksidativna aktivnost v pentanski frakciji v primerjavi s piknogenolom in frakcijo, pridobljeno po patentnem postopku.

vzorec	delež polifenolov v suhem ekstraktu [%]	antioksidativna aktivnost glede na piknogenol
piknogenol	36,2	1
ekstrakt CHCl_3	58,3	1,09
ekstrakt C_5H_{12}	54,8	1,27

Rezultati nam kažejo, da je skorja navadne smreke dober alternativni vir skorji obmorskega bora iz katerega pripravljajo Pycnogenol[®], ki ga uporabljamo kot prehransko

dopolnilo. Postopek pridobivanja izboljšamo, če namesto kloroforma uporabimo pentan. Smrekova skorja je sicer zelo dostopen in poceni vir, saj v lesarstvu velike količine smrekovega lubja predstavljajo odpad.

5 SKLEPI

1. Ekstrakte iz skorje navadne smreke smo pripravili po patentnem postopku za piknogenol, upoštevali pa smo spremembe, ki so jih ugotovili v eni prejšnjih diplomskih nalog (24). Nekatero parametre ekstrakcije smo določili sami, kot nam je to narekovalo laboratorijsko delo.
2. Določili smo topilo s katerim lahko oborimo proantocianidine. Namesto kloroforma bi lahko uporabili pentan, s katerim smo dobili zelo čist ter po vsebnosti in antioksidativni aktivnosti s piknogenolom primerljiv, če ne celo boljši produkt. V primerjavi s kloroformom dobimo tudi 3-krat večjo količino nastale oborine.
3. Vsebnost polifenolov v ekstraktih smo določali spektrofotometrično s Folin-Ciocalteaujevo metodo. Ugotovili smo, da ekstrakt skorje vsebuje 1,6-krat več polifenolov izraženih kot pirogalol kot piknogenol. S pentanom smo oborili 1,7-krat večjo količino polifenolov kot jih vsebuje piknogenol.
4. Antioksidativno aktivnost smo določali z DPPH metodo. Največjo antioksidativno aktivnost smo določili ekstraktu, ki smo ga oborili s pentanom. Njegova aktivnost je 1,3-krat večja kot pri piknogenolu, ekstraktu oborjenim s kloroformom smo določili 0,96-krat manjšo aktivnost.
5. Na podlagi zaključkov do katerih smo prišli, menimo da je skorja navadne smreke (*Picea abies*) možen alternativni vir skorji obmorskega bora (*Pinus pinaster*). Tudi zamenjava kloroforma s pentanom bi bila smiselna.

6 LITERATURA

1. Manček B, Pečar S (2001). *Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih*. Farm Vestn 52: 133-144.
2. Tišler M (1991). *Organska kemija – 7. Izdaja*. Državna založba Slovenije, Ljubljana: 177-192
3. Bresjanac M, et. al. (2001). *Izbrana poglavja iz patološke fiziologije – 9. izdaja*. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana: 15-37
4. Valko M, Rhodes C.J., Moncol J, Izakovič M, Mazur M (2005). *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chemico-Biological interactions 160: 1 - 40
5. Bruneton J (1999). *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants – 2. Izdaja*. Paris Cedex:225 - 400
6. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004). *Polyphenols: Food sources and bioavailability*. Am J Clin Nutr 79: 727-747.
7. Prijatelj N (2005). *Farmakognozija. Kemijska struktura naravnih spojin: učbenik za 4. letnik programa farmacevtski tehnik – 1. izdaja*, DZS, Ljubljana:82 - 86
8. Verstraeten SV, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG, Oteiza PI (2003). *Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruptions of the bilayer structure*. Free Radical Biology & Medicine 34(1): 84-92.
9. Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K (1999). *Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α -linolenic acid*. Free Radical Biology & Medicine 27(11/12): 1313-1323.
10. Tourino S, Selga A, Jimenez A et al. (2005). *Procyanidin fractions from Pine (Pinus Pinaster) bark: Radical scavenging power in solution, antioxidant activity in emulsion, and antiproliferative effect in melanoma cells*. J Agric Food Chem 53: 4728-4735.
11. Jerez M, Selga A, Sineiro J, Torres JL, Nunez MJ (2007). *A comparison between bark extracts from Pinus pinaster and Pinus radiata: Antioxidant activity and procyanidin composition*. Food Chem 100: 439-444.

12. <http://www.viva.si/clanek.asp?id=2554>, 25. 02. 2008.
13. Podobnik A (2003). *Raznolikost živih bitij - 2. Izdaja*. Državna založba Slovenije, Ljubljana: 104 - 120
14. <http://www.trebnik.com/zelisca/smreka.php>, 25. 02. 2008.
15. Slimestad R (2003). Flavonoids in buds and young needles of *Picea*, *Pinus* and *Abies*, *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 1247-1255.
16. Pan H, Lundgren LN (1995). *Phenolic extractives from root bark of Picea abies*. *Phytochemistry* 39: 1423-1428.
17. Heemann V, Francke W (1977). *Volatile constituents from the bark of picea abies (L.) Karst*. *Planta medica* 32(4): 342-346.
18. Masquelier J (1987). *Plant extract with a proanthocyanidins content as therapeutic agent having radical scavenger effect and use thereof*. United States Patent, Patent number 4,698,360.
19. <http://waterhouse.ucdavis.edu/phenol/foolinmicro.htm>, 25. 02. 2008.
20. Molyneux P (2004). *The use of stable free radical diphenylpicryl-hydrazine (DPPH) for estimating antioxidant activity*. *Songklanakarin J Sci Technol.* 26(2): 211-219.
21. <http://www.chemicaland21.com/info/SOLVENTS.htm>, 25. 02. 2008.
22. http://chemweb.unp.ac.za/chemistry/Physical_Data/Solvent_properties.htm, 25. 02. 2008
23. M. The Merck index, 12 ed., 1996
24. Umek N (2006). *Optimizacija izolacije antioksidantov iz izbranih rastlinskih virov*. Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana.