

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

GREGOR TRSTENJAK

**OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE IN IZOLACIJE
ANTIOKSIDATIVNIH POLIFENOLOV IZ LUBJA
NAVADNE JELKE (*Abies alba* Mill.)**

**OPTIMIZATION OF ANTIOXIDATIVE POLYPHENOLS
ISOLATION AND EXTRACTION FROM SILVER FIR
BARK (*Abies alba* Mill.)**

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm..

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in somentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm., za nasvete in strokovno pomoč pri izdelavi diplomskega dela. Prav tako se zahvaljujem vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo. Zahvala gre tudi družini, Maruški in prijateljem, ki so mi skozi vsa leta študija stali ob strani in me vzpodbujali ter motivirali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

Gregor Trstenjak

Ljubljana, november 2010

VSEBINA

I. UVOD	1
1. RADIKALI.....	1
1.1. Reakcije radikalov	1
1.2. Pregled nekaterih reaktivnih zvrsti ter radikalov	2
2. OKSIDATIVNI STRES	4
3. ANTIOKSIDANTI.....	6
4. POLIFENOLNE SPOJINE KOT ANTIOKSIDANTI.....	12
4.1. FLAVONOIDI	13
4.2. TANINI	16
5. PIKNOGENOL	18
6. NAVADNA JELKA (<i>Abies alba</i> Mill.)	19
II. NAMEN DELA	21
III. MATERIALI IN METODE	22
1. RASTLINSKI MATERIAL	22
2. APARATURE IN OPREMA	22
3. KEMIČALIJE	23
4. METODE	24
4.1. Postopek izolacije polifenolnih spojin	24
4.2. Določanje antioksidativne aktivnosti polifenolnih spojin z DPPH metodo	25
4.3. Določanje vsebnosti polifenolnih spojin s Folin-Ciocalteau-jevo metodo	26
4.4. Analizna HPLC	27
IV. EKSPERIMENTALNO DELO.....	28
1. PRIPRAVA IZVLEČKA IZ LUBJA OBMORSKEGA BORA	28
2. PRIPRAVA IZVLEČKA IZ LUBJA NAVADNE JELKE.....	29
3. DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI POLIFENOLNIH SPOJIN Z DPPH METODO.....	35
4. DOLOČANJE VSEBNOSTI POLIFENOLNIH SPOJIN S FOLIN-CIOCALTEAU-JEVO METODO	36
5. ANALIZNA HPLC	37
V. REZULTATI.....	38
1. PRIPRAVA IZVLEČKA IZ LUBJA OBMORSKEGA BORA	38

2. PRIPRAVA IZVLEČKA IZ LUBJA NAVADNE JELKE.....	39
3. DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI POLIFENOLNIH SPOJIN Z DPPH METODO.....	41
4. DOLOČANJE VSEBNOSTI POLIFENOLNIH SPOJIN S FOLIN-CIOCALTEAUJEVO METODO	43
5. ANALIZNA HPLC	46
5.1. Kromatogrami izvlečkov iz lubja bora.....	46
5.2. Kromatogrami izvlečkov iz lubja jelke	48
VI. RAZPRAVA.....	62
1. IZVLEČEK IZ LUBJA OBMORSKEGA BORA	62
2. IZVLEČKI IZ LUBJA NAVADNE JELKE	62
VII. SKLEPI	71
VIII. LITERATURA.....	73

POVZETEK

Kisik je nujno potreben za naše življenje na Zemlji. Po drugi strani pa nam škoduje zaradi oksidacijskih procesov, do katerih pride zaradi radikalov in drugih kisikovih reaktivnih zvrsti, ki nastajajo pri reakcijah kisika v celicah. Organizmi so tako že tekom evolucije razvili obrambo pred oksidativnim stresom, ki je vzrok številnih bolezni. To obrambo predstavljajo antioksidanti. Nekateri od njih so prisotni že v telesu, druge pa vnašamo s hrano (veliko jih je predvsem v sadju in zelenjavi) ali s prehranskimi dopolnili.

Med najmočnejše antioksidante sodijo proantocianidini, na tržišču poznamo izvleček iz skorje obmorskega bora pod imenom Pycnogenol®. Namen našega dela je bil optimizirati postopek izolacije in ekstrakcije antioksidativnih polifenolov (proantocianidinov) iz skorje navadne jelke, ki se je v predhodnih raziskavah na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani izkazala kot ustrezna alternativa tako po vsebnosti antioksidativnih polifenolov kot po antioksidativni aktivnosti.

Pri procesu optimizacije smo se oprli na patentni postopek za abigenol (razvit na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani), ki smo ga spreminjali tako, da smo uporabljali različna topila, različne izhodne materiale in spreminjali pogoje ekstrakcije. Celokupno vsebnost polifenolov smo določali s Folin-Ciocalteu-jevo metodo, antioksidativno aktivnost pa z DPPH metodo.

Ugotovili smo, da so bila vsa alternativna topila (topilo, uporabljeno v patentnem postopku je etilacetat), ki smo jih uporabili, neustrezna, saj nam je nastalo bodisi premalo produkta, ali pa je produkt imel prenizko vsebnost polifenolov in/ali nizko antioksidativno aktivnost. Prav tako so nam slabe rezultate dali spremenjeni pogoji (čas, temperatura) ekstrakcije ter drugi izhodni materiali (suhi in tekoči vodni ekstrakt iz podjetja Tanin Sevnica, d.d.). Kljub številnim spremembam v patentnem postopku je torej še vedno najbolj ustrezen patentni postopek za abigenol. Vsekakor pa bi zaradi slabe robustnosti celotnega postopka bilo vredno preizkusiti še druge metode izolacije in ekstrakcije antioksidativnih polifenolov iz skorje jelke.

ABSTRACT

Oxygen is of vital importance to life on Earth. On the other hand, it can be harmful because of the oxidation processes, occurring on the count of radicals and other reactants in oxygen, which are a product of cellular respiration. Through evolution, organisms have therefore developed defense against oxidative stress, which causes a variety of conditions. This defense comes in the form of antioxidants. Some of them are already present in the human body and other are ingested with food (most of them through fruits and vegetables) or food supplements.

The strongest antioxidants are proanthocyanidins; there is an extract of maritime pine bark named Pycnogenol[®] on the market. The purpose of this thesis was to optimize the isolation and extraction processes of antioxidant polyphenols (proanthocyanidins) from the bark of European silver fir, which proved to be a legitimate alternative as far as the content of antioxidant polyphenols and antioxidant activities are concerned, as was discovered in previous studies at the Faculty of Pharmacy in Ljubljana.

We based the optimization process on a patented procedure for abigenol (developed at the Faculty of Pharmacy in Ljubljana), which we changed in a manner to use various solvents and output materials and we also changed the conditions of extraction. The entire content of polyphenols was determined with the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity with DPPH method.

We discovered that all used alternative solvents are inadequate, because they either yielded too small amounts of product or the product had too little polyphenols and/or antioxidant activity. Changed conditions (time, temperature) of extraction and other output materials (dry and liquid water extract of the company Tanin Sevnica, d.d.) also produced unsatisfying results. Despite numerous changes to the patented procedure it remains the most efficient patented procedure for abigenol. In any case, other methods for isolating and extracting antioxidant polyphenols from the bark of European silver fir are worth looking into on the count of poor robustness of the entire procedure.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACE – angiotenzin pretvarjajoči encim

AOP – antioksidacijski potencial

DNA – deoksiribonukleinska kislina

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

FC – Folin-Ciocalteu

FRAP – (ang. Ferric Reducing Antioxidant Power), antioksidativna moč redukcije železa

GSH – glutation

GSSH – oksidirana oblika glutationa

HPLC – (ang. High Performance Liquid Chromatography), visoko zmogljiva tekočinska kromatografija

LDL – (ang. Low Density Lipoprotein), lipoprotein nizke gostote

RNS – reaktivne dušikove spojine

RONS – reaktivne kisikove in dušikove spojine

ROS – reaktivne kisikove spojine

SOD – superoksidna dismutaza

TFA – trifluoroocetna kislina

UV – ultra-vijolično

I. UVOD

1. RADIKALI

Radikali so v kemiji atomi, molekule, ioni ali kompleksi, ki imajo neparno število elektronov (vsaj na enem od energijskih nivojev imajo en nesparjen elektron). Radikali imajo lahko bodisi pozitiven bodisi negativen naboj ali pa so nevtralni. Radikali z lihim številom elektronov so zelo reaktivni, njihov razpolovni čas je med milijoninko in milijardinko sekunde. Zelo reaktivni so tudi radikali s sodim številom nesparjenih elektronov, ki imajo nasprotno spino (kisikov singlet v obliki radikala). V nasprotju z reaktivnimi radikali pa kemično bolj stabilni radikali reagirajo nekaj velikostnih razredov počasneje z drugimi molekulami, ki niso radikali. Kemično bolj stabilni radikali so molekule, ki imajo sodo število elektronov, vendar vsaj dva elektrona na različnih nivojih s spinoma v isti smeri. Primera stabilnih radikalov sta tripletni kisik in dušikov dioksid (1).

1.1. Reakcije radikalov

Radikalske reakcije so večinoma verižne reakcije. Potekajo v treh stopnjah:

1.) Nastanek radikalov (inicijacija)

- homolizna cepitev vezi: $\mathbf{R_1:R_2} \rightarrow \mathbf{R_1\cdot} + \mathbf{R_2\cdot}$
- redukcija: $\mathbf{R} + \mathbf{e^-} \rightarrow \mathbf{R^{\cdot-}}$ (nastane radikal anion)
- oksidacija: $\mathbf{R} - \mathbf{e^-} \rightarrow \mathbf{R^{\cdot+}}$ (nastane radikal kation)
- ionizacija: $\mathbf{R} + \mathbf{h\nu} \rightarrow \mathbf{R^{\cdot+}} + \mathbf{e^-}$

2.) Nadaljnje reakcije radikalov (širitev oziroma propagacija):

Radikali so zaradi težnje po pritegnitvi še enega elektrona praviloma kratkoživi in kemično reaktivni. Ponavadi reagirajo kar s snovmi, ki jih srečajo v svoji neposredni okolici na tri načine:

- z odvzemom vodika: $\mathbf{R_1\cdot} + \mathbf{R_2-H} \rightarrow \mathbf{R_1-H} + \mathbf{R_2\cdot}$
- s prenosom elektrona (redoks reakcija): $\mathbf{R\cdot} + \mathbf{e^-} \rightarrow \mathbf{R^{\cdot-}}$ ali $\mathbf{R\cdot} - \mathbf{e^-} \rightarrow \mathbf{R^{\cdot+}}$
- z adicijo na dvojno vez: $\mathbf{R\cdot} + \mathbf{CH_2=CH-R_1} \rightarrow \mathbf{R-CH_2-CH\cdot-R_1}$

3.) Prekinitev radikalskih reakcij (terminacija):

- reakcija dveh radikalov: $R_1 \cdot + R_2 \cdot \rightarrow R_1-R_2$
- prekinitev reakcij zaradi delovanja antioksidantov (2).

1.2. Pregled nekaterih reaktivnih zvrsti ter radikalov

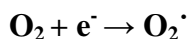
Pregled reaktivnih zvrsti ter radikalov prikazuje **Preglednica I**.

Preglednica I: Reaktivne kisikove, dušikove in žveplove spojine (1, 3).

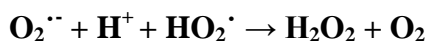
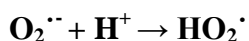
<i>Reaktivne kisikove spojine (ROS)</i>	<i>Reaktivne spojine (RNS)</i>	<i>dušikove</i>	<i>Reaktivne žveplove spojine (RSS)</i>
Radikali			
OH \cdot - hidroksilni radikal	NO \cdot - dušikov oksid		RS \cdot - tiilni radikal
O $_2^{\cdot -}$ - superoksidni anionski radikal	NO $_2 \cdot$ - dušikov dioksid		
3O_2 - tripletni kisik (biradikal)			
RO \cdot - alkoksilni radikal			
ROO \cdot - peroksilni radikal			
HOO \cdot - hidroperoksilni radikal			
Ne-radikali			
O $_3$ - ozon	ONOO $^-$ - peroksinitrit		
H $_2$ O $_2$ - vodikov peroksid	N $_2$ O $_3$ - didušikov trioksid		
1O_2 - singletni kisik	N $_2$ O $_4$ - didušikov tetraoksid		
HOCl - hipoklorna kislina	NO $_2^+$ - nitronijev kation		
ROOH - hidroperoksid	NO $^+$ - nitrozil kation		
ROOR - peroksid	NO $^-$ - nitroksil anion		

Superoksidni radikal

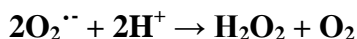
Nastaja pri enoelektronski redukciji molekulskega kisika:



Vir elektrona je lahko endogen (oksidazna encimska reakcija) ali eksogen (ionizirajoče sevanje, produkti presnove ksenobiotikov). Je radikal, ki se v telesu tvori v največji meri, in sicer nastaja v procesu dihalne verige, pri fagocitozi, pri mikrosomskem elektronskem transportu (citokrom P-450), pri encimskih oksidacijah in pri avtooksidacijah raznih substratov. Je samo posredno pomemben pri biokemijskih poškodbah, saj jih večino povzročijo druge reaktivne zvrsti, ki nastanejo pri reakcijah superoksidnega aniona (hidroksilni radikal, vodikov peroksid). Glavno škodljivo delovanje superoksidnega aniona pa je redukcija kovinskih ionov (Haber-Weissova, Fentonova reakcija), kar vodi v nastajanje hidroksilnega radikala. Poglavitna reakcija superoksidnega aniona je dismutacijska reakcija, ki poteka v dveh stopnjah:



Celotna reakcija pa izgleda takole:



Superoksidni radikal, ki ni močno reaktiven in vodikov peroksid lahko difundirata iz kraja nastanka, vodikov peroksid kot električno nevtralna zvrst lahko tudi prehaja membrane, superoksidni radikal pa ne more, razen, če so v membranah ustrezni anionski kanali (1).

Hidroksilni radikal (OH[·])

Hidroksilni radikal je ena od najbolj reaktivnih spojin, ki nastajajo v človeškem organizmu, ki lahko reagira s skoraj vsako biološko molekulo.

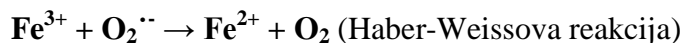
Reagira na tri načine:

- $\text{OH}^{\cdot} + \text{LH} \rightarrow \text{L}^{\cdot} + \text{H}_2\text{O}$ (odtegnitev vodika)
- $\text{R}_1\text{-CH=CH}_2 + \text{OH}^{\cdot} \rightarrow \text{R}_1\text{-CH}^{\cdot}\text{-CH}_2\text{-OH}$ (adicija na dvojno vez)
- $\text{Cl}^{\cdot} + \text{OH}^{\cdot} \rightarrow \text{Cl}^{\cdot} + \text{OH}^{\cdot}$ (prenos elektrona –redoks reakcija)

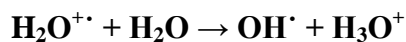
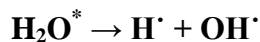
Hidroksilni radikal nastane pod vplivom ionizirajočega sevanja, ultrazvoka, pod vplivom ozona in pri reakcijah, kataliziranih s kovinami (Fentonove reakcije):

- *Fentonove reakcije (predvsem z bakrovimi in železovimi ioni)*





- *Homolizna cepitev vode (zaradi ionizirajočega sevanja)*



Hidroksilni radikal je tako primarni krivec za škodljive učinke ionizirajočih žarkov pri posrednem nastajanju radikalov pod njihovim vplivom (1).

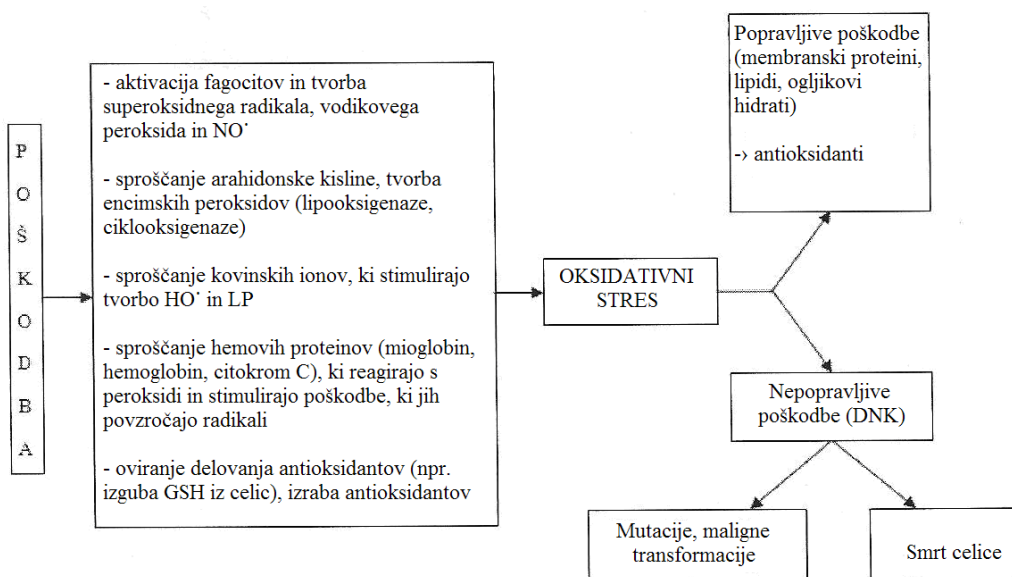
Vodikov peroksid (H₂O₂)

Nastaja predvsem kot posledica odstranjevanja superoksidnega aniona z dismutazo ali peroksidazo. Neposredno lahko inaktivira encime s -SH skupinami. Oksidira lahko tudi nekatere ketokislino, npr. piruvično. Lahko prehaja celične membrane in lahko zaradi majhne reaktivnosti reagira z molekulami daleč od mesta nastanka. V citosolu lahko reagira z železovimi in bakrovimi ioni, iz teh reakcij nastaja hidroksilni radikal (1).

2. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres (**Slika 1**) je porušenje ravnotežja med nastajanjem radikalov in škodljivih reaktivnih spojin ter med antioksidativno obrambo telesa. Do tega porušenja pride zaradi razlogov, kot so: povečano nastajanje ROS in RNS (zaradi fizičnega napora, sevanja, vnetja, psihičnega stresa), zmanjšan vnos antioksidantov s hrano, povečan vnos kovinskih ionov (predvsem železovih in bakrovih) in zaradi zmanjšane aktivnosti encimov, ki odstranjujejo radikale (katalaza, glutation peroksidaza, superoksidna dismutaza).

Pri oksidativnem stresu večjega obsega pride do motenj v presnovi celice, poškodb DNA, lipidne peroksidacije, poškodb proteinskih membranskih sistemov in do povečanja koncentracije kalcijevih ionov v celici (4).



Slika 1: Poškodba tkiva in antioksidativni stres (4).

Posledice oksidativnega stresa so tako lahko številne bolezni: maligne bolezni, diabetes, ateroskleroza ter posledično hipertenzija, kronično vnetje, avtoimunske bolezni, staranje ter ishemija tkiv (1, 2).

Organizem torej pred delovanjem radikalov in drugih reaktivnih zvrsti potrebuje zaščito, ki jo predstavljajo antioksidanti.

3. ANTIOKSIDANTI

Pod imenom antioksidant označujemo spojine, ki zavrejo ali zmanjšajo oksidacijo drugih snovi (proteinov, lipidov in DNA) (5).

V **Preglednici II** je predstavljenih nekaj antioksidantov in njihove lokacije.

Preglednica II: Pregled in lokacije antioksidantov (1).

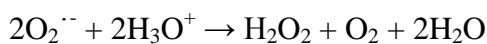
V CELICI	V CELIČNI MEMBRANI	IZVEN CELICE
superoksidne dismutaze	α – tokoferol	ceruloplazmin (inaktivira Cu^+ ter deloma Fe^{2+})
katalaza	karotenoidi	transferin in laktoferin, ki vežeta Fe^{3+}
glutationska peroksidaza		hemopeksin in haptoglobin, ki vežeta hem
		ekstracelularna superoksidna dismutaza
		α – tokoferol, raztopljen v plazemskih lipidih
		mukus, ki lovi OH^\cdot

V grobem delimo antioksidante na:

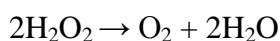
a.) ENCIMSKE ANTIOKSIDANTE

Delujejo tako, da modificirajo svoj substrat (radikale in RONS) tako, da nastanejo manj toksični produkti in ne nastanejo radikali. Njihova pomembna lastnost je, da se vedno znova regenerirajo. Mednje sodijo superoksidne dismutaze (SOD) ter hidroksiperoxidaze (katalaza in glutation peroksidaza) (2).

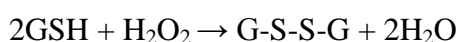
Superoksidna dismutaza je ime za družino metaloproteinskih encimov, ki katalizirajo naslednjo reakcijo:



Katalaza razgrajuje vodikov peroksid:



Glutationska peroksidaza odstranjuje vodikov peroksid tako, da ga porablja za oksidacijo glutationa (GSH):



Katalaza in glutationska peroksidaza torej z odsrtanjem $2O_2^{\cdot\cdot}$ in H_2O_2 onemogočita nastajanje zelo reaktivnih hidroksilnih radikalov (OH^{\cdot}) (1).

b.) NEENCIMSKE ANTIOKSIDANTE

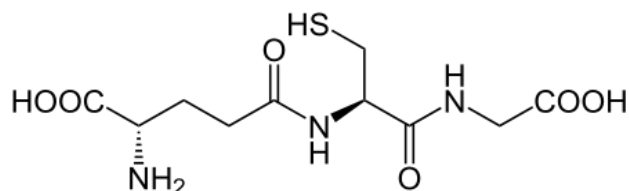
Delujejo tako, da preprečujejo, zmanjšajo ali ustavljajo verižne oksidativne reakcije preko različnih mehanizmov:

- reagirajo z radikali, preden ti dosežejo biološke molekule; s tem delujejo kot preprečevalci sprožitve radikalske reakcije ali kot prekinjevalci verižne reakcije – tako preprečijo na primer lipidno peroksidacijo,
- z vezanjem ionov kovin prehoda, s čimer zmanjšajo nastanek hidroksilnih radikalov,
- s takšnim razgrajevanjem peroksidov, da ne nastanejo radikali,
- s stabilizacijo peroksidnih derivatov,
- ali z odvzemanjem energije singletnemu kisiku (2).

Glutation

Glutation (**Slika 2**) je tripeptid, sestavljen iz naslednjih aminokislin: γ -glutamata, cisteina in glicina. Ker ga sintetizirajo celice iz osnovnih aminokislin, ga ni potrebno vnašati s hrano. Zaradi visoke koncentracije in ključne vloge pri vzdrževanju celičnega redoks stanja, je glutationski eden najpomembnejših celičnih antioksidantov. Glutation najdemo v dveh oblikah, in sicer v reducirani (GSH) ter oksidirani obliki (GSSH). V reducirani obliki tiolna skupina, ki je odgovorna za antioksidativno aktivnost glutationskega, reducira prisotne nestabilne metabolite in oksidante. Zaradi izgube elektrona, ki ga donira reaktivni spojini, postane glutationski radikal in reagira z drugo radikalsko molekulo glutationskega ter nastane oksidirana oblika glutationski disulfid (GSSH). GSH se nato iz GSSH regenerira s pomočjo encima glutationski reduktaza. V zdravem organizmu tako najdemo 90% glutationskega v reducirani obliki, 10% pa v oksidirani obliki. Zvišano razmerje GSSH proti GSH je indikacija za oksidativni stres.

Glutation je torej glavni celični antioksidant kot neposredni lovilec radikalov in singletnega kisika, regenerira vitamina C in E, regulira cikel dušikovega oksida, ima pomembno vlogo pri detoksifikaciji ksenobiotikov in organskih ter anorganskih karcinogenov. Prav tako je nujno potreben pri delovanju imunskega sistema, pri sintezi in popraviljanju DNA, sintezi proteinov, sintezi prostaglandinov, transportu aminokislin in aktivaciji encimov (2,5).

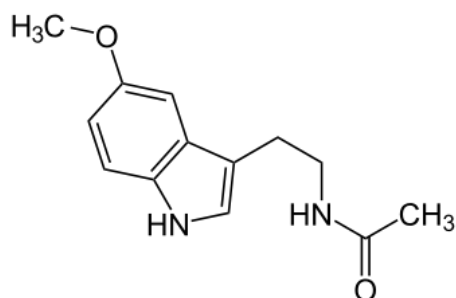


Slika 2: Glutation (6).

Melatonin

Melatonin (**Slika 3**) je človeku lasten hormon, ki sodeluje pri dnevnem ciklu spanje-budnost tako, da povzroča zaspanost in zniža telesno temperaturo.

Melatonin kot antioksidant deluje kot lovilec naslednjih toksičnih spojin: hidroksilnega radikala, hipoklorne kisline, singletnega kisika, vodikovega peroksida, dušikovega oksida ter peroksinitritnega aniona in njegovih metabolitov. Prav tako je bilo ugotovljeno, da deluje antioksidativno preko vplivov na encime. Tako zvišuje raven mRNA ter aktivira antioksidativne encime kot so: superoksidna dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza ter glukoza-6-fosfat dehidrogenaza. Nasprotno pa zmanjša aktivnost prooksidativnega encima inducibilna sintetaza dušikovega oksida (5).



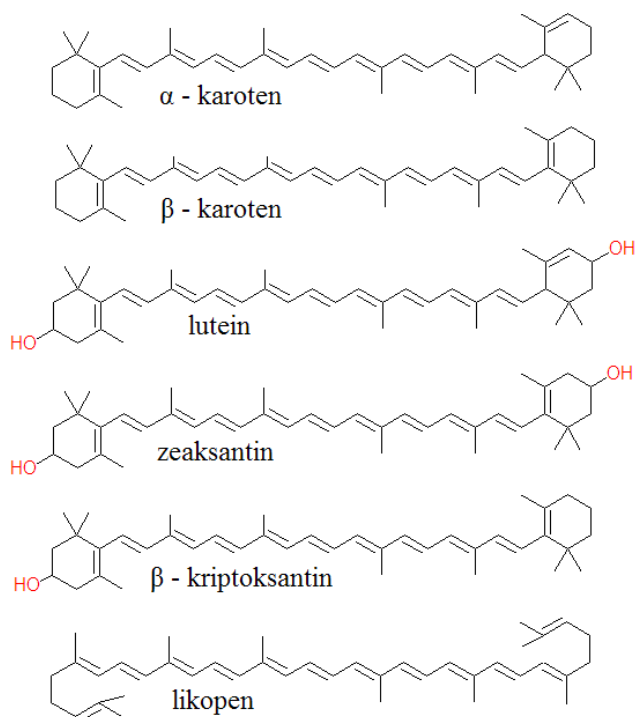
Slika 3: Melatonin (6).

Karotenoidi

Karotenoidi (**Slika 4**) so skupina več kot 600 različnih tetraterpenoidnih spojin, ki imajo v rastlinah vlogo barvil. Najdemo jih tudi v algah ter nekaterih nižjih organizmih. V grobem jih ločimo v dve skupini:

- ksantofile – vsebujejo kisik (lutein, zeaksantin) in
- karotene – ne vsebujejo kisika (α -karoten, β -karoten, likopen).

Zaradi sistema konjugiranih dvojnih vezi so rumene, oranžne ali rdeče barve. Glavni vir karotenoidov v človeški prehrani sta sadje in zelenjava, ki vsebujeta nekatere najbolj znane karotenoide (α -karoten, β -karoten, likopen, lutein, zeaksantin itd.). Kot antioksidanti so karotenoidi učinkoviti lovilci reaktivnih kisikovih spojin, kot so singletni kisik in peroksilni radikali. Njihova antioksidativna aktivnost izvira iz sistema konjugiranih dvojnih vezi. Pod različnimi pogoji lahko delujejo različno, tako na primer β -karoten deluje antioksidativno pri nizkem parcialnem tlaku kisika, pri visokem parcialnem tlaku kisika pa deluje prooksidativno (5).

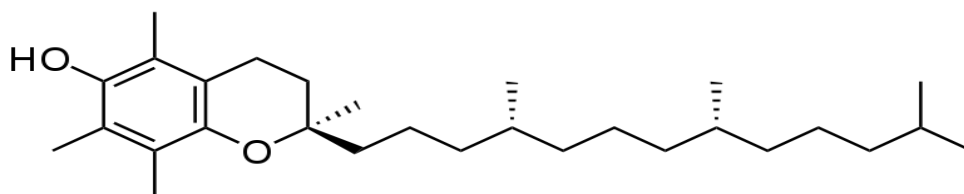


Slika 4: Različne oblike karotenoidov (7).

Vitamin E

Pod imenom vitamin E (**Slika 5**) označujemo osem različnih oblik (α , β , γ in δ) tokoferolov in tokotrietonolov. Njegova najbolj aktivna oblika je α -tokoferol. Vitamin E je najbolj učinkovit naravni lipidotopni antioksidant (nahaja se v membrani celic), ki ščiti celice, natančneje nenasičene maščobne kisline v celičnih membranah pred lipidno peroksidacijo. Poleg tega ima še druge funkcije, kot so: regulacija agregacije trombocitov preko inhibicije nastanka prostaglandinov (tromboksana), regulacija aktivacije protein kinaze C, zaščita vitamina A pred razpadom v telesu, zaščita pred izgubo selena, prav tako pa ima vlogo pri metabolizmu proteinov ter nukleinskih kislin ter pri produkciji hormonov (5).

Reagira s superoksidom, singletnim kisikom, hidroksilnim radikalom. Prav tako pa reducira bakrove ione med oksidacijo lipidov, zaradi česar lahko deluje tudi kot prooksidant. Najpomembnejša je reakcija s sekundarnimi peroksilnimi in alkoksilnimi radikali. Oksidirane α -tokoferoksilne radikale, ki nastanejo pri teh reakcijah, lahko regenerirajo askorbat, ubikinol ali glutation (4).



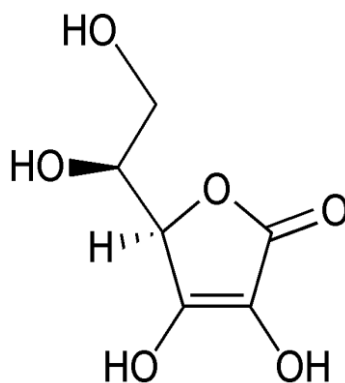
Slika 5: Vitamin E (6).

Vitamin C

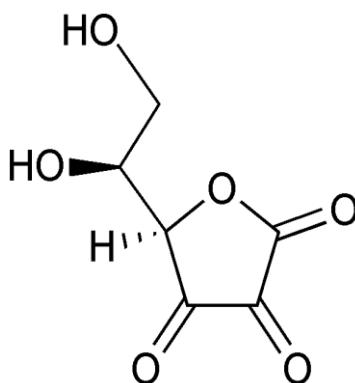
Vitamin C ali askorbinska kislina je vodotopen vitamin, ki ga najdemo v mnogih rastlinah, predvsem sadju in zelenjavi (paprika, brokoli, citrusi, kivi, mango, paradižnik, papaja, jagode,...). Askorbat (ion askorbinske kisline) je nujno potreben za številne metabolne reakcije v človeškem organizmu. V organizmu je prisoten v dveh oblikah, in sicer v reducirani (*L*-askorbinska kislina) (**Slika 6**) ter oksidirani (*L*-dehidroaskorbinska kislina) (**Slika 7**). Pomanjkanje vitamina C vodi v bolezen, imenovano skorbut (motnja pri nastanku kolagena), katerega značilna posledica je krvavenje iz dlesni. Bolezen danes več ni tako pogosta, včasih pa se je pojavljala predvsem v severnih zemljepisnih širinah in med mornarji zaradi pomanjkanja sadja in zelenjave, bogate z vitaminom C.

Vitamin C je najpomembnejši antioksidant v zunajcelični tekočini. Je pomemben kofaktor mnogih biosinteznih encimov (hidroksilaz, oksigenaz), ki so vključeni v sinteze kolagena,

karnitina in kateholaminov. Kot močan antioksidant reagira z reaktivnimi kisikovimi spojinami (superoksidom, peroksilnimi radikali, alkoksilnimi radikali, s kisikovim singletom in z ozonom), reaktivnimi dušikovimi spojinami (dušikovim oksidom, dušikovim dioksidom, peroksinitritom), reaktivnimi klorovimi spojinami (kloramini, hipoklorna kislina). Prav tako vitamin C regenerira druge antioksidante, kot so α -tokoferol, urat in β -karoten. S tem, ko regenerira α -tokoferol, vitamin C preprečuje peroksidacijo lipidov v lipoproteinih majhne gostote, s tem pa preprečuje aterosklerozo (5). Vitamin C pa lahko deluje tudi kot prooksidant, in sicer ob navzočnosti železovih ter bakrovih ionov v vodnih raztopinah. To njegovo delovanje je odvisno od razmerja koncentracij kovinskih ionov in vitamina C: če je koncentracija askorbata v primerjavi s koncentracijo kovinskih ionov majhna, bo posredno deloval kot prooksidant, če pa je koncentracija askorbata velika, bo učinkoval kot antioksidant (1).



Slika 6: Askorbinska kislina (6).

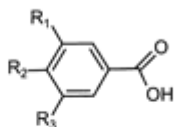


Slika 7: Dehidroaskorbinska kislina (6).

4. POLIFENOLNE SPOJINE KOT ANTIOKSIDANTI

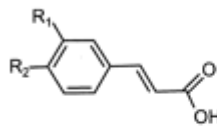
Poznamo nekaj tisoč molekul s polifenolno strukturo. Te molekule nastanejo kot produkt sekundarnega metabolizma rastlin. Njihovi glavni funkciji sta zaščita rastlin pred ultravijoličnimi žarki in pred napadom patogenov. Polifenolne skupine lahko razdelimo v razrede glede na število fenolnih obročev, ki jih vsebujejo, in glede na strukturne elemente, ki povezujejo te fenolne obročje med seboj (**Slika 8**). Po tej razdelitvi jih delimo na: fenolne kisline, flavonoide, stilbene in lignane. Ker je polifenolnih spojin tako veliko in se nahajajo v skoraj vseh delih rastlin, jih lahko najdemo vezane z različnimi ogljikovimi hidrati in organskimi kislinami, lahko pa se povežejo tudi med seboj (8).

Hidroksibenzojske kisline



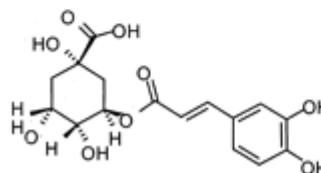
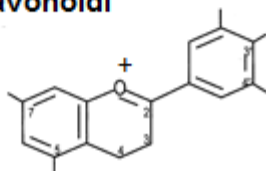
$R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Galna kislina

Hidroksicimetne kisline



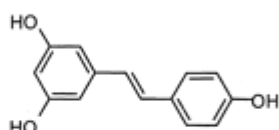
$R_1 = OH$: Kumarna kislina
 $R_1 = R_2 = OH$: Kavna kislina
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$: Ferulna kislina

Flavonoidi



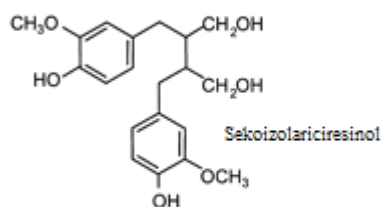
Klorogenska kislina

Stilbeni



Resveratrol

Lignani

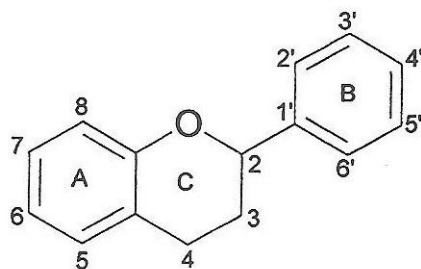


Sekoisolariciresinol

Slika 8: Različne strukture polifenolov (8).

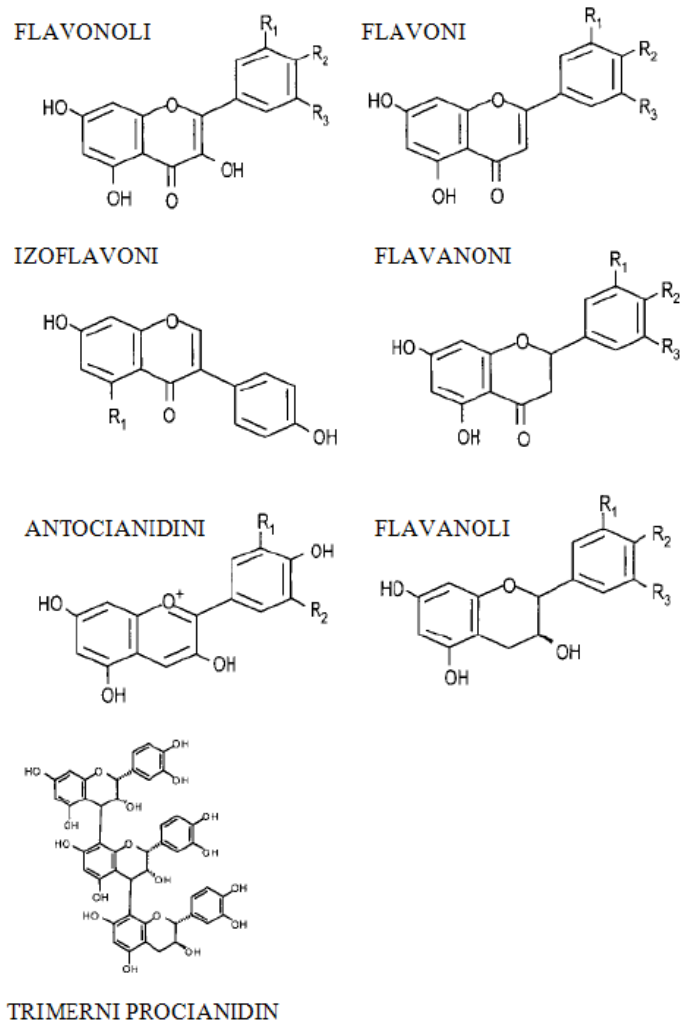
4.1. FLAVONOIDI

Flavonoidi predstavljajo najbolj raziskano in največjo skupino rastlinskih polifenolov. Do danes je identificiranih že več kot 4000 različnih flavonoidov. Za rastline so pomembni kot rastlinski pigmenti, kot zaščita pred UV žarki, kot insekticidi in kot fungicidi. Njihova osnovna struktura je $C_6-C_3-C_6$ (9). Večina flavonoidov ima enak osnovni skelet, to je 2-fenilbenzopiran (**Slika 9**):



Slika 9: 2-fenilbenzopiran (5).

Na tem osnovnem skeletu imajo vezanih več hidroksilnih skupin, kar je pomembno za njihovo antioksidativno aktivnost. V rastlinah jih večinoma najdemo v obliki glikozidov. V grobem jih delimo na antocianine ter antoksantine. Antocianini so glikozidi antocianidina in so najpomembnejša skupina vodotopnih rastlinskih pigmentov, ki obarvajo rastline rdeče, modro in vijolično. Antoksantini, med katere sodijo flavonoli, flavanoli, flavoni, flavanoni in izoflavoni pa so brezbarvni ali beli oziroma rumeni (5). Flavonoide torej lahko razdelimo v šest glavnih podrazredov (**Slika 10**): flavone (apigenin, luteolin), flavonole (kvercetin, miricetin), flavanone (naringenin, hesperidin), flavanole (katehin, epikatehin), izoflavone (genistein, daidzein) in antocianidine (cianidin, pelargonidin) (9).



Slika 10: Različne strukture flavonoidov (8).

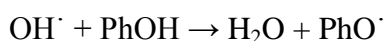
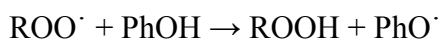
Flavonoidom pripisujejo več biokemičnih aktivnosti, med katere sodijo:

- inhibicija oksidacijskih procesov (kot lovilci radikalov in kelatorji kovinskih ionov),
- inhibicija ksantinske oksidaze,
- inhibicija glutationske reduktaze,
- inhibicija NADPH oksidaze,
- inhibicija lipoksigenaze,
- preventivno delovanje pred citotoksičnimi učinki oksidiranih LDL,
- inhibicija protein kinaze C,
- inhibicija ciklične AMP fosfodiesteraze,
- inhibicija fosfolipaze A₂,
- inhibicija od kalcija odvisnih ATP-az.

Antioksidativno delujejo kot reducenti, kot donatorji vodikovega atoma, kot lovilci singletnega kisika ter kot kelatorji kovinskih ionov. Da je nek polifenol definiran kot antioksidant, mora zadostovati naslednjima pogojevima:

- že v nizkih koncentracijah (v primerjavi s substratom) zakasniijo ali preprečijo oksidacijo, povzročeno z radikali,
- radikal, ki nastane po interakciji z oksidantom, mora biti stabilen, da lahko prekine verižno reakcijo oksidacije.

Fenolni antioksidanti inhibirajo oksidacijo z donacijo vodikovega atoma reaktivnemu radikal, nastali radikal pa je stabilen, tako da ne reagira naprej:



Pod nekaterimi pogoji, na primer pri visokem pH, pri visoki koncentraciji polifenolnih antioksidantov ali v prisotnosti železovih ionov, pa se lahko polifenolni antioksidanti obnašajo kot pro-oksidanti, saj pride do avtooksidativnih procesov.

Za antioksidativno delovanje polifenolov je zaslužna njihova struktura. Ugotovili so, da je za antioksidativno aktivnost ugodno, če so v strukturi prisotni naslednji elementi:

- *orto*-dihidroksi struktura obroča B, ki daje večjo stabilnost nastalemu radikal ter sodeluje v delokalizaciji elektrona,
- dvojna vez med ogljikoma 2 in 3, ki ustvari keto skupino na ogljiku 4, ti pa sodelujeta v delokalizaciji elektronov,
- hidroksilni skupini na ogljikovih atomih 3 in 5 v obročih C in A.

Antioksidativna učinkovitost flavonoidov je neposredno povezana z njihovo stopnjo hidroksilacije, znižana pa je če so na –OH skupine pripeti sladkorji. Flavonoidi so učinkoviti lovilci hidroksilnih in peroksilnih radikalov (zato so uspešni inhibitorji lipidne peroksidacije) in superoksidnega aniona. Nekateri pa s keliranjem kovinskih ionov prehodnih elementov inhibirajo Fentonove in Haber-Weissove reakcije, ki so pomemben vir kisikovih radikalov (5).

4.2. TANINI

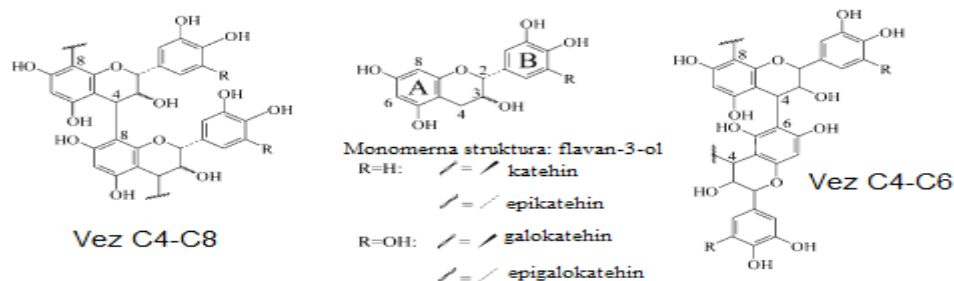
Tanini oziroma čreslovine so spojine polifenolnega izvora. Imajo veliko afiniteto do proteinov in z njimi tvorijo komplekse. Največkrat jih lahko razdelimo v dve skupini:

- hidrolizirajoče čreslovine (galotanini, elagotanini) in
- kondenzirane čreslovine oziroma proantocianidine (oligomeri iz katehina, epikatehina ali galokatehina) (10).

Kondenzirane čreslovine

Proantocianidini oziroma kondenzirane čreslovine so sekundarni rastlinski metaboliti, ki se nahajajo predvsem v skorji in lupini skoraj vseh rastlin. V uporabi so predvsem zaradi njihovega adstringentnega delovanja, kar je posledica tvorbe kompleksov s proteini (8). Poleg kompleksov s proteini tvorijo komplekse še s kovinskimi ioni, ogljikovimi hidrati in alkaloidi.

Strukturno so proantocianidini dimeri, oligomeri in polimeri flavan-3-olov (katehina in epikatehina) povezani z vezjo med C4 in C8 in/ali med C4 in C6 (procianidini tipa B) (**Slika 11**). Proantocianidini tipa A pa imajo poleg vezi C4-C8 še etersko vez med C2 in O7. V grobem jih lahko razdelimo na procianidine, ki so tudi njihovi najpogostejši predstavniki ter prodelfinidine. Procianidini so sestavljeni iz katehina, epikatehina in/ali estrov galne kisline, prodelfinidini pa so sestavljeni iz galokatehina, epigalokatehina in/ali njihovih derivatov z galno kislino.



Slika 11: Strukture flavan-3-olskih monomerov ter kondenziranih čreslovin (11).

Znano je njihovo protimikrobno, protivnetno, antioksidativno, protialergijsko in antihipertenzivno delovanje (12,13).

Do zdaj so bile znane naslednje povezave med antioksidativno aktivnostjo in strukturo:

- antioksidativna aktivnost narašča do neke stopnje polimerizacije, kar si lahko razlagamo z delokalizacijo elektronov znotraj monomerov,
- ugotovljena je bila višja antioksidativna aktivnost v prisotnosti estrov galne kisline, vendar je ta naraščala le do določene stopnje polimerizacije,
- z večanjem števila hidroksilnih skupin se večja tudi antioksidativna aktivnost (14).

Antioksidativno delujejo preko različnih mehanizmov, in sicer kot lovilci radikalov, kelatorji kovinskih ionov ter s sodelovanjem z endogenimi antioksidanti, kot sta glutation ter superoksidna dismutaza. K antioksidativnemu delovanju pa pripomore še, da delujejo antiproliferacijsko, kot regulatorji celičnega cikla in induktorji apoptoze (15).

Proantocianidini se od drugih rastlinskih polifenolov razlikujejo po tem, da so polimeri in da imajo visoko molekulsko maso. Zaradi tega je omejena njihova absorpcija iz gastrointestinalnega trakta, absorbirajo pa se lahko le, če jih razgradimo v manjše enote (8).

5. PIKNOGENOL

Z izrazom piknogenol so prvotno imenovali celoten razred flavonoidov, sestavljenih iz derivatov flavan-3-ola. Danes pa je Pycnogenol® zaščiten izraz, ki označuje naraven standardiziran izvleček iz skorje obmorskega bora (*Pinus maritima* Mill.), ki raste ob jugozahodni obali Francije v pokrajini Gaskonija, kjer klimatske razmere močno vplivajo na karakteristike te vrste bora. Pknogenol je eden izmed najmočnejših antioksidantov na trgu.

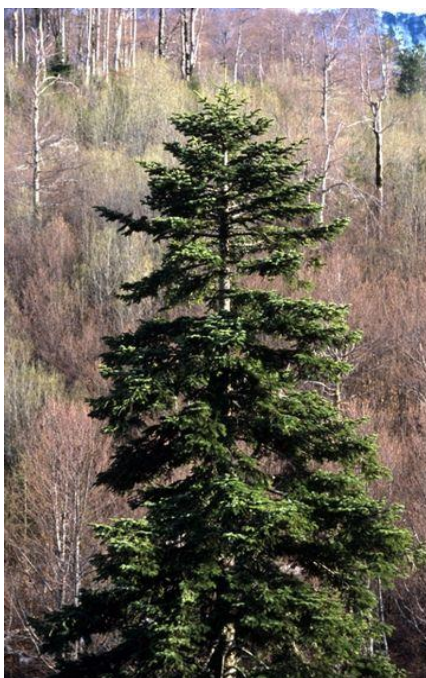
Pknogenol ima nekaj desetkrat močnejši antioksidacijski učinek kot vitamina E in C. Antioksidativno deluje, ker je lovilec radikalov in kelator kovinskih ionov. Študije kažejo, da se pknogenol po peroralnem vnosu dobro absorbira iz prebavil in se že po dvajsetih minutah razporedi po vsem organizmu. Pknogenol 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, saj deluje kot vazorelaksans, inhibitor encima angiotenzin konvertaza (ACE), inhibitor zlepljanja trombocitov, izboljša pa tudi mikrocirkulacijo z zmanjšanjem prepustnosti kapilar. Deluje tudi protivnetno. Uporabljajo ga lahko tudi diabetiki. Blaži tudi simptome predmenstrualnega sindroma, upočasnjuje napredovanje paradontopatij in pospeši regeneracijo manjših površinskih poškodb kože.

Izvleček je zmes približno 50 učinkovin – flavonoidov, predvsem procianidinov ter fenolnih kislin. Podobne učinkovine lahko najdemo v grozdnih pečkih, kjer pa jih ne najdemo v tolikšnih količinah in niso tako raznolike ter variirajo od ekstrakta do ekstrakta (različne vrste grozdja), medtem ko je pri pknogenolu sestava vedno konstantna. V glavnem je pknogenol sestavljen iz monomernih polifenolov (katehin, epikatehin, taksifolin) ter procianidinov. V njem najdemo, kot že omenjeno, tudi fenolne kisline (kavna kislina, ferulna kislina ter *p*-hidroksibenzojska kislina) ter produkte glikozilacije, kot so na primer glukopiranozilni derivati flavanolov ter fenolnih kislin (5, 16).

Pknogenol se pridobiva po patentnem postopku (17).

6. NAVADNA JELKA (*Abies alba* Mill.)

Navadna oziroma bela jelka (**Slika 12**) spada v deblo Pinophyta (iglavci), razred Pinopsida, red Pinales (borovci), družino Pinaceae (borovke) in rod *Abies* (jelka). Je do 50 m visok iglavec z belo-sivim lubjem (**Slika 13**), ki ostane dolgo gladko, s starostjo pa postane ploščato razpokano in potemni. Krošnja je sprva enakomerno stožčasta, s starostjo pa postane na vrhu sploščena. Raste predvsem v gorovjih srednje in južne Evrope. V Sloveniji raste v iglastih in mešanih gozdovih od nižin do gorskega pasu. Doseže starost od 200-300 let, za rast potrebuje visoko zračno vlažnost in hranilna tla. Igllice so izrobljene, sploščene, z dvema svetlima voščenenima progama spodaj. So posamične, dvoredne, dolge od 2-3 cm, široke pa okoli 2 mm. Jelka ima cvetove dveh vrst, in sicer moške in ženske. Oboji zrastejo na istem drevesu. Moški cvetovi so manjši, sestavlja jih podaljšana cvetna os, na kateri so spiralno nameščeni prašniki. Ženski cvetovi, ki so združeni v socvetja pa se po oploditvi razvijejo v storže. Storži so pokončni, zeleno-rjavi, dolgi od 10-15 cm. Luske ob zrelosti odpadajo posamič, na koncu ostane le pokončna storževa os.



Slika 12: Navadna jelka (*Abies alba* Mill.) (6).

V farmaciji pridobivajo iz navadne jelke eterično olje iz svežih iglic (*Abietis albae aetheroleum*) ter iz zelenih storžkov (*Oleum templini*). V eteričnem olju iz svežih iglic prevladujejo monoterpeni kot bornilacetat, pinen, limonen, kamfen in felandren, v

eteričnem olju storžkov pa prevladuje limonen. Eterično olje jelke pomaga pri izkašljevanju, deluje protimikrobno in dražeče na kožo ter tako povečuje prekrvavljenost podkožja. Uporabljajo ga tudi za inhalacije pri obolenjih dihalnih poti, v balzamih za prehlad, za vtiranje in kopeli ter tudi pri revmatičnih težavah, motnjah prekrvavitve ter nategih (6, 18, 19, 20).

Kot je bilo potrjeno v predhodnih raziskavah na Fakulteti za farmacijo, pa je lubje pomembno zaradi vsebnosti polifenolnih spojin, ki delujejo antioksidativno. Raziskav o podrobnejši sestavi pa še ni (21).



Slika 13: Lubje navadne jelke (6).

II. NAMEN DELA

Namen našega dela je, kot že naslov diplomskega dela pove, optimizirati postopek ekstrakcije in izolacije antioksidativnih polifenolov iz lubja navadne jelke. Lubje navadne jelke je, kot je že bilo ugotovljeno v predhodnih raziskavah na naši fakulteti, primeren alternativni vir lubju bora, iz katerega izdelujejo piknogenol, ki je že kar nekaj časa na našem trgu. Med drugim je prednost navadne jelke, da je lahko dostopen in poceni material, saj predstavlja odpad v lesni industriji.

Izveček iz lubja navadne jelke bomo najprej pripravili po patentnem postopku za abigenol, le-tega pa bomo potem poskušali izboljšati z zamenjavo topil ter spremembami pogojev ekstrakcije. Te izvlečke, pridobljene po različnih postopkih, bomo nato primerjali s pripravljenim piknogenolom, ki je na tržišču.

Primerjali bomo celokupno vsebnost polifenolnih spojin s Folin-Ciocalteu-jevo metodo ter antioksidativno aktivnost z DPPH metodo.

III. MATERIALI IN METODE

1. RASTLINSKI MATERIAL

Uporabljali smo:

- več vzorcev lubja navadne jelke (*Abies alba* Mill.), ki smo jih dobili iz podjetja Tanin Sevnica d.d. (nabrana septembra 2009), nato smo uporabljali lubje navadne jelke, nabrane aprila v okolici Kočevja, ki je bila ročno lupljena ter dva dni sušena v kurilnici,
- mleto lubje iz skorje navadne jelke iz podjetja Tanin Sevnica d.d., nabrano septembra 2009,
- lubje obmorskega bora, nabranega v okolici Pulja (december 2009),
- suhi vodni ekstrakt iz lubja jelke, Tanin Sevnica d.d. (september, 2009),
- suhi vodni ekstrakt iz lubja jelke, Tanin Sevnica d.d. (januar, 2010),
- tekoči vodni ekstrakt iz lubja jelke, Tanin Sevnica d.d. (april, 2010).

2. APARATURE IN OPREMA

- analizna tehtnica – KERN ALS 120-4, Kern&Sohn GmbH (Balingen, Nemčija)
- tehtnica Mettler PC 2000, Mettler-Toledo, Inc., (Columbus, OH, ZDA)
- UV/VIS Spektrometer Lambda bio+, Perkin Elmer (Beaconsfield, Velika Britanija)
- magnetno mešalo in grelec Rotamix 550 MM (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- električni kuhalnik, Corona (Kranj, Slovenija)
- električni mlinček, Waring blender, Model HGBTWT, Waring (Torrington, CT, ZDA)
- centrifuga 400R, 18000/min, Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- kolona Ascentis Express RP-18 100 × 4,6 mm, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ZDA)
- kromatografski sistem Shimadzu Prominence: DGU-20A5, LC-20AD XR, SIL-20AC, CPO-20AC, SPD-M20A, CBM-20A, Shimadzu (Kyoto, Japonska)
- rotavapor R-200, Büchi Labortechnik AG (Flawil, Švica)
- vodna kopel za rotavapor B-490, Büchi Labortechnik AG (Flawil, Švica)

- vakuumska črpalka za rotavapor Vac V-500, Büchi Labortechnik AG (Flawil, Švica)
- aparatura za kontrolo vakuumske črpalke V-800, Büchi Labortechnik AG (Flawil, Švica)
- digestorij Variolab Mobilien W90, Waldner (Wangen, Nemčija)
- avtomatske pipete, Biohit-Proline, Biohit (Helsinki, Finska)
- nastavki za pipete, Biohit (Helsinki, Finska)
- sušilnik za lase Beauty Compact 1300, Philips (Eindhoven, Nizozemska)
- sanitetna vata 100% bombaž, Tosama (Domžale, Slovenija)
- filter papir, Assistent (Sondheim, Nemčija)

3. **KEMIKALIJE**

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, D913-2, Sigma Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- brezvodni natrijev sulfat, 31481, Riedel de Haën (Seelze bei Hannover, Nemčija)
- etilacetat, AC0154, Scharlau chemie (Barcelona, Španija)
- brezvodni etanol, 4146072, Carlo Erba reagenti (Rodano, Italija)
- metanol, 414816, Carlo Erba reagenti (Rodano, Italija)
- aceton, 400971, Carlo Erba reagenti (Rodano, Italija)
- pentan, 468151000, Carlo Erba reagenti (Rodano, Italija)
- heptan, 446787, Carlo Erba reagenti (Rodano, Italija)
- natrijev klorid, SO 0225, Scharlau chemie (Barcelona, Španija)
- Pycnogenol®, French Maritime pine bark extract, F0400, Biolandes (Le Sen, Francija)
- Folin-Ciocalteu-jev fenolni reagent, 47641, Fluka, (Buchs, Švica)
- brezvodni natrijev karbonat, 479307, Carlo Erba (Milano, Italija)
- prečiščena voda (hišni sistem z reverzno osmozo)
- molekularna sita, 20.860-4, Sigma Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- galna kislina, 48630, Fluka (Buchs, Švica)
- HPLC voda, 115333, Merck (Darmstadt, Nemčija)
- HPLC MeCN, 100030, Merck (Darmstadt, Nemčija)
- trifluoroocetna kislina (TFA), 411561, Carlo Erba (Milano, Italija)

4. METODE

4.1. Postopek izolacije polifenolnih spojin

Polifenolne spojine smo ekstrahirali z maceracijo pri povišani temperaturi, in sicer smo rastlinsko lubje zmleli v električnem mlinčku, prelili z vodo ter segrevali določen čas.

Ker smo se ukvarjali z optimizacijo ekstrakcije in izolacije, je bil naš namen, da pogoje ekstrakcije izberemo tako, da se iz našega lubja izloči čim večja količina spojin v najkrajšem možnem času s čim manj stroški. Prav tako je pomembno, da se ekstrahira čim manj nezaželenih snovi in da s povišano temperaturo ne »uničimo« antioksidativnih spojin.

Pri pridobivanju izvlečka iz jelkega in borovega lubja smo se opirali na patentni postopek za piknogenol, po katerem pridobivajo proantocianidine iz lubja obmorskega bora:

100 kg lubja obmorskega bora uprašimo in ga ekstrahiramo s tolikšno količino vrele vode, da dobimo 250 litrov raztopine, ki jo iztisnemo iz uprašene droge. Raztopino ohladimo na 20°C in jo filtriramo. Filtratu dodamo toliko natrijevega klorida, da pride do nasičenja (namesto natrijevega klorida lahko uporabimo 20% (ut./vol.) 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 sušilno sredstvo brezvodni natrijev sulfat. 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 obarjanje v kloroformu. Postopek zaključimo s spiranjem proantocianidinov s kloroformom in sušenjem pod znižanim tlakom. Temperatura komore naj ne presega 50°C (17).

Oziroma še natančneje, opirali smo se na patentni postopek za abigenol:

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.

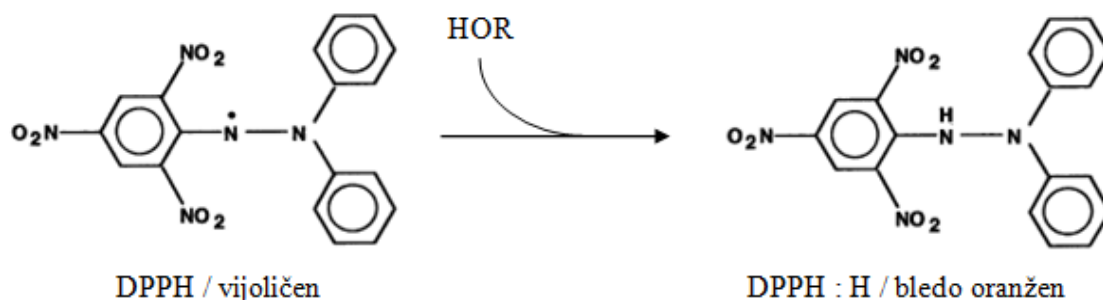
V 8 epruvt z debelimi stenami smo odmerili po 2 mL etilacetatnega ekstrakta in dodali po 6 mL izbranih topil. Zmes smo pustili v hladilniku (+4°C) čez noč. Nastala je oborina. Zmes smo centrifugirali 5 minut pri 4000 obr.min⁻¹ in nato previdno odlili bistro raztopino. Dobljene oborine smo sušili v sušilniku pri 50 – 60°C do konstantne mase (22).

Pri postopku optimizacije ekstrakcije smo patentni postopek spremenili tako, da smo spreminjali pogoje ter uporabljali druga, nadomestna topila. Postopek smo izvajali tudi z manjšo količino droge.

4.2. Določanje antioksidativne aktivnosti polifenolnih spojin z DPPH metodo

Ena izmed metod, ki se uporabljajo za določanje antioksidativnega potenciala različnih spojin je DPPH. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilni radikal vijoličaste barve. Prosti elektron je delokaliziran po celotni molekuli, kar onemogoči dimerizacijo molekule. Delokalizacija elektrona da molekuli DPPH-ja intenzivno vijolično barvo z visokim absorpcijskim maksimumom pri valovni dolžini okrog 520 nm. Ko raztopini DPPH primešamo snov, ki je donor vodikovega atoma (antioksidant), nastane reducirana oblika molekule in posledično pride do izgube intenzivne vijolične barve (spremeni se v blede oranžno). To reakcijo zaznamo s padcem absorbance. Pri reakciji se DPPH reducira do hidrazina (**Slika 14**), iz molekule antioksidanta pa nastane nov radikal, ki v primeru, ko antioksidant donira 2 vodikova atoma, v naslednji stopnji reagira z novo molekulo DPPH. Stehiometrija reakcije je odvisna od števila molekul DPPH, ki jih reducira ena molekula reducenta (antioksidanta). Če antioksidant donira en vodikov atom, gre za stehiometrijo 1:1, če pa lahko donira 2 vodikova atoma pa gre za stehiometrijo 2:1, kar nam pove, da lahko ena molekula antioksidanta reducira dve molekuli DPPH.

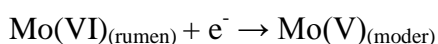
Raztopini vzorca smo dodali pripravljeno raztopino DPPH, premešali in pustili stati 30 minut. Nato smo merili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm (23).



Slika 14: Reakcija radikala DPPH z antioksidantom.

4.3. Določanje vsebnosti polifenolnih spojin s Folin-Ciocalteau-jevo metodo

Metoda s Folin-Ciocalteau-jevim (FC) reagentom temelji na mehanizmu oksidacije in redukcije in jo kot tako lahko uvrščamo med antioksidacijske metode. Folin Ciocalteau-jev reagent je raztopina polimernega ionskega kompleksa iz fosfomolibdenovih in fosfovolframovih kislin, ki oksidira fenolate. Metoda s FC reagentom meri redukcijske sposobnosti vzorca (reducirajo se heteropoli kisline), zato je ponavadi njeno ujemanje z metodami za merjenje antioksidacijskega potenciala (DPPH, FRAP,...), ki temeljijo na podobnem principu, tako dobro. Pri oksidaciji fenolov s FC reagentom dobimo modro obarvan produkt, ki ga merimo pri valovni dolžini 745-755 nm.



Metoda je hitra in precizna, vendar ni selektivna za fenole, saj lahko vpliva nanjo vrsta organskih in anorganskih snovi (glukoza, fruktoza, askorbinska kislina, proteini,...), ki dajo lažno povišan rezultat koncentracije fenolov. Metoda je občutljiva na pH medij, ki mora biti bazičen (pH~10). V kislem je reakcija počasnejša. Prav tako lahko na rezultate vplivajo zunanji vplivi (svetloba, temperatura,...).

Raztopini vzorca smo dodali FC reagent ter destilirano vodo. Po 4 minutah smo dodali še raztopino natrijevega karbonata. Zmes smo dobro premešali in jo pustili stati 90 minut, nato smo merili absorbanco pri 755 nm. Fenole smo določili kot ekvivalent galne kisline (24, 25).

4.4. Analizna HPLC

Pri HPLC analizi smo uporabljali kolono Ascentis Express RP-18. Izvajali smo reverzno fazno HPLC z gradientno elucijo. Kot mobilno fazo A smo uporabljali vodo z 0,1% TFA, kot mobilno fazo B pa MeCN z 0,1% TFA.

IV. EKSPERIMENTALNO DELO

1. PRIPRAVA IZVLEČKA IZ LUBJA OBMORSKEGA BORA

Prav tako kot z lubjem jelke, smo za primerjavo opravili še nekaj preizkusov z lubjem obmorskega bora.

1. Zdrobili smo 100 g lubja bora, dodali 1 L vode in **segrevali 2 uri 70°C**. Nato smo še vroče filtrirali skozi vato. Takoj zatem smo izvedli ekstrakcijo z etilacetatom. Ekstrakcijo smo ponovili trikrat, vselej smo uporabili okoli 500 mL etilacetata. Nato smo dodali natrijev sulfat za sušenje ter na magnetnem mešalu mešali čez noč. Organsko fazo, ki se je mešala čez noč, smo prefiltrirali skozi vato in nato začeli koncentrirati na rotavaporju. Ko se je raztopina začela motniti, smo jo oborili s pentanom. Za tem smo nastalo oborino filtrirali pod znižanim tlakom, kar je ostalo na filtru smo s filtrom vred prenesli v bučko in odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C do konstantne mase. Ostanek na filtru je bil naš željen produkt.
2. Nato smo spet zdrobili 100 g lubja, dodali 1 L vrele vode ter **namakali ob vrenju 15 minut**. Raztopino smo še vročo filtrirali skozi vato in izvedli ekstrakcijo z etilacetatom. Po trikratni ekstrakciji smo zbrali vso lipofilno fazo in dodali natrijev sulfat ter mešali čez noč. Raztopino, ki se je mešala čez noč, smo prefiltrirali skozi vato ter koncentrirali na rotavaporju do zamotnitve. Nato smo obarjali s pentanom. Za tem smo nastalo oborino filtrirali pod znižanim tlakom, kar je ostalo na filtru smo s filtrom vred prenesli v bučko in odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C do konstantne mase. Ostanek na filtru je bil naš željen produkt.

2. PRIPRAVA IZVLEČKA IZ LUBJA NAVADNE JELKE

Ker smo izvajali optimizacijo ekstrakcije, smo izvleček iz lubja navadne jelke izvedli po mnogih postopkih:

- 1. Zdrobili smo 50 g jelkinega lubja, dodali 250 mL prečiščene vode** ter namakali v erlenmajerici **2 uri pri 70°C**. Potem smo raztopino ohladili ter prefiltrirali z navadnim filter papirjem v lijaku. Z rotavaporjem smo nato **odparili do suhega pri 70°C**. Tako smo dobili suhi vodni ekstrakt. Le tega smo raztopili v **30 mL acetona**. Dobljeno raztopino smo **5 minut centrifugirali pri 3000 obratih/s**. Po končanem centrifugiranju smo bistro tekočino zbrali v eno bučko ter spet uparili do suhega. Po uparitvi do suhega smo dodali **30 mL acetona** ter **90 mL pentana**, da smo raztopino z acetonom oborili. Nastalo oborino smo nato centrifugirali in uparili do suhega še to fazo.
- 2. Zdrobili smo jelkino lubje, natehtali 50 g zmlete droge, dodali 250 mL prečiščene vode in namakali 2 uri pri 70°C**. Še vroče smo nato filtrirali skozi vato, ostanek v erlenmajerici smo splahnili še s 100 mL vroče vode. Nato smo izvedli ekstrakcijo z etilacetatom v liju ločniku, uporabili smo enak volumen etilacetata kot smo imeli vodnega filtrata. Ekstrakcijo smo ponovili trikrat. Po razbitju emulzije, ki nam je nastala, smo vodno fazo zbrali in zavrgli, organsko fazo pa smo dali v bučko in ji dodali 105 mg sušilnega sredstva NaSO_4 . Čez noč smo pustili to raztopino mešati z magnetnim mešalom. Drug dan smo raztopino filtrirali skozi vato, nato smo uparevali na rotavaporju do količine 100 mL. Za tem smo dodali 300 mL pentana za nastanek oborine. Oborino smo filtrirali ob znižanem tlaku. Filter z našim produktom smo potem posušili z rotavaporjem v bučki, enako smo naredili tudi s filtratom, ki je ostal v liju.
- 3. V naslednjem primeru smo uporabili lubje, ki smo ga dobili iz podjetja Tanin Sevnica d.d. Natehtali smo 100 g droge ter namakali eno uro s 500 mL prečiščene vode pri 100°C**. Nato smo še vroče filtrirali skozi vato, ostanek smo sprali še s 100 mL vroče vode ter filtrirali. Za tem smo izvedli direktno ekstrakcijo z etilacetatom, in sicer z enako količino etilacetata kot smo imeli vodnega filtrata.

Postopek smo ponovili trikrat. Vodno fazo smo zavrgli, organski fazi pa smo dodali sušilno sredstvo, in sicer toliko, da se le-to ni več sprijemalo v kepe. Na magnetnem mešalu smo to organsko fazo potem mešali čez noč. Drugo jutro smo raztopino filtrirali, da smo odstranili sušilno sredstvo. Nato smo raztopino uparevali pod znižanim tlakom na rotavaporju do nastanka motne raztopine. Sledilo je obarjanje s trikratno količino heptana. Za tem smo filtrirali pod znižanim tlakom, kar je ostalo na filtru smo s filtrom vred prenesli v bučko ter odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C do konstantne mase. Ostanek na filtru smo s filtrom vred prenesli v bučko ter odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C. Ostanek na filtru je bil naš željen produkt.

- 4. Zatehtali smo 50 g lubja iz podjetja Tanin Sevnica d.d.. Namakali smo ga 1 uro z 250 mL vode pri 70°C.** Nato smo še vroče filtrirali skozi vato, ostanek smo sprali še s 100 mL vroče vode in filtrirali še to. **Sledilo je uparevanje na rotavaporju do suhega pri 70°C. Tako smo dobili suhi vodni ekstrakt.** Ker smo ugotovili, da je suhi vodni ekstrakt dobro topen v **acetonu s 5% vode**, smo suhemu ekstraktu dodali **50 mL acetona s 5% vode**, čakali da se raztopi in prefiltrirali, dodali 10 g sušilnega sredstva ter pustili čez vikend. Nato smo raztopino prefiltrirali in obarjali s trikratno količino pentana. Oborino smo filtrirali ob znižanem tlaku, kar je ostalo na filtru smo s filtrom vred prenesli v bučko in odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C do konstantne mase. Ostanek na filtru je bil naš željen produkt.

Enak postopek smo ponovili še s suhim vodnim ekstraktom iz podjetja Tanin Sevnica d.d., uporabili smo 5 g ekstrakta.

- 5. Natehtali smo 5 g suhega vodnega ekstrakta iz podjetja Tanin Sevnica d.d.. Dodali smo 250 mL vode. Iz vodne raztopine smo nato izvedli tekočo ekstrakcijo z etilacetatom,** in sicer smo uporabili enak volumen etilacetata kot je bilo vodne faze, postopek smo ponovili trikrat. Vodno fazo smo nato zavrgli, organski fazi pa smo dodali sušilno sredstvo (toliko, da se ne kepi) in pustili mešati na magnetnem mešalu čez noč. Raztopino, ki smo jo mešali čez noč, smo nato uparevali na rotavaporju pri 50°C do zamotnitve raztopine. Nato smo dodali trikratni presežek heptana in nastala je oborina. To oborino smo nato filtrirali pod

- znižanim tlakom in kar je ostalo na filtru, je bil naš produkt. Produkt smo nato sušili pri 50°C na rotavaporju do konstantne mase.
6. Spet smo zatehtali **5 g suhega vodnega ekstrakta iz podjetja Tanin Sevnica d.d. ter ga raztopili v 50 mL acetona**. Ko se je raztopilo, smo raztopino prefiltrirali in dodali 10 g sušilnega sredstva ter mešali na magnetnem mešalu čez noč. **Naslednji dan smo raztopino spet prefiltrirali in obarjali s trikratno količino pentana**. Nato smo nastalo oborino filtrirali pod znižanim tlakom, kar je ostalo na filter papirju je bil naš produkt. Produkt smo sušili pri 50°C na rotavaporju do konstantne mase.
 7. Nato smo iskali optimalno topilo za suhi vodni ekstrakt, ugotovili smo, da je potencialno dobro topno v brezvodnem etanolu.
Zatehtali smo **5 g suhega vodnega ekstrakta iz podjetja Tanin Sevnica d.d. in dodali 50 mL etanola**. Nato smo filtrirali ter dodali 10 g sušilnega sredstva (natrijevega sulfata). Vse to smo pustili stati čez vikend. Nato smo premešano raztopino filtrirali ter uparevali na rotavaporju do zamotnitve raztopine. Raztopino smo nato oborili s trikratno količino pentana. Oborino smo nato filtrirali pod znižanim tlakom in ostanek na filtru je bil naš željen produkt, ki pa smo ga nato še sušili pri 50°C do konstantne mase na rotavaporju.
 8. Spet smo iskali potencialno topilo za naš vzorec, in sicer smo poizkušali z etilacetatom, nasičenim z vodo. Tako smo **100 mL etilacetata stresali s 25 mL vode v liju ločniku, odlili vodno fazo in za ekstrakcijo uporabili 50 mL nasičenega etilacetata**. Kot izhodni material smo uporabili 5 g suhega vodnega ekstrakta iz podjetja Tanin Sevnica d.d..
 9. Nato smo poizkusili s čistim, brezvodnim etilacetatom, prav tako smo **natehtali 5 g suhega vodnega ekstrakta iz podjetja Tanin Sevnica d.d. ter dodali 50 mL brezvodnega etilacetata**. V tem topilu se je ves suhi vodni ekstrakt raztopil, prav tako pa ni prišlo do težav z lepljenjem raztopine na steno erlenmajerice. Mešali smo čez noč in počakali do naslednjega dne. Naslednji dan smo filtrirali skozi najbolj fin steklen filter (št. 4), koncentrirali z rotavaporjem do zamotnitve ter dodali

trikratno količino heptana za nastanek oborine. Oborino smo nato filtrirali pod znižanim tlakom in kar je ostalo na filtru, smo s filtrom vred prenesli v bučko in odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C do konstantne mase. Ostanek na filtru je bil naš željen produkt.

Enak postopek smo naredili še z bolj hidrofilnim metilacetatom.

10. Zamislili smo si, da bi poizkusili mešati aceton z brezvodnim etanolom. Na podlagi HPLC rezultatov smo prišli do zaključka, da bi bilo najbolje suhi vodni ekstrakt topiti v acetonu z 20% etanola. Sicer pa smo na HPLC preizkusili raztopine s 5, 10, 15, 20 in 25% etanola v acetonu (**Slika 20 – Slika 24**).

Tako smo izvedli poskus, **zatehtali smo 5 g suhega vodnega ekstrakta iz podjetja Tanin Sevnica d.d. ter dodali 50 mL 20% etanola v acetonu**, dali na magnetno mešalo in mešali čez noč. Suhi vodni ekstrakt, raztopljen v 20% etanolu v acetonu, ki se je čez noč mešal smo prefiltrirali skozi filter št. 4, odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C do zamotnitve in nato dodali trikratno količino pentana. Ni izpadla oborina, vse se je samo zamotnilo, čez čas je nastala zmes, podobna lepljivi smoli. Predvidevali smo, da je bila vmes voda, zato smo spet odparili na rotavaporju do suhega, raztopili v 25 mL absolutnega etanola, nato spet odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C do suhega, spet raztopili v etanolu in zatem oborili s pentanom. Oborino, ki je nastala, smo filtrirali pod znižanim tlakom in kar je ostalo na filtru, smo s filtrom vred prenesli v bučko ter odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C do konstantne mase. Ostanek na filtru smo s filtrom vred prenesli v bučko in odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C do konstantne mase. Ostanek na filtru je bil naš željen produkt.

11. Preizkusili smo tudi ekstrakcijo z mešanico brezvodnega etanola in etilacetata. Čisti etanol ekstrahira preveč taninov, v samem etilacetatu pa suhi vodni ekstrakt ni topen. Etanol ter etilacetat imata približno isto vrelišče, tako da bi se v proizvodnji oba destilirala skupaj. Zato smo raztopili piknogenol v različnih koncentracijah mešanice in videli smo da, imamo pri 50% mešanici čisto malo oborine, pri 60% etanola v etilacetatu pa je piknogenol popolnoma topen.

Nato smo raztapljali še suhi vodni ekstrakt iz tanina, vzorec centrifugirali, odpipetirali ustrezno količino za HPLC, posušili do suhega in razredčili z vodo.

Nato smo dali na analizo s HPLC (**Slika 25 – Slika 44**). Izkazalo se je, da smo dobili ustrezen profil pri 10% etanolu v etilacetatu, vendar bi sedaj potrebovali petkrat več topila za ustrezno topnost, kar pomeni razmerje droga:topilo = 1:15. Enako smo poizkušali še z metanolom v etilacetatu. Metanol ekstrahira še več neželenih snovi, saj je bolj hidrofilen, tako da tudi ta ni najbolj primeren za ekstrakcijo. Kljub temu pa smo **natehtali dvakrat po 5 g suhega vodnega ekstrakta iz podjetja Tanin Sevnica d.d. in dodali po 45 mL etilacetata v obe erlenmajerici; v eno pa nato 5 mL etanola in v drugo 5 mL metanola** ter pustili mešati čez noč z magnetnim mešalom. Drugi dan smo premešani raztopini filtrirali skozi steklen filter št. 4, koncentrirali na rotavaporju pri 50°C do zamotnitve in nato oborili s heptanom. Za tem smo nastalo oborino filtrirali pod znižanim tlakom, kar je ostalo na filtru smo s filtrom vred prenesli v bučko in odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C do konstantne mase. Ostanek na filtru je bil naš željen produkt.

12. Da bi preizkusili čim več načinov pridobivanja ekstrakta iz lubja jelke, smo kot izhodni material uporabili še tekoči vodni ekstrakt iz lubja jelke, ki so nam ga pripravili v podjetju Tanin Sevnica d.d.. Tako smo **100 g tekočega vodnega ekstrakta direktno ekstrahirali z etilacetatom v liju ločniku**. Natehtanim 100 g smo dodali 200 mL etilacetata. Ker je že pri tej prvi paralelki nastal problem, in sicer nastanek emulzije, ki jo je bilo nemogoče razbiti, smo postopek opustili.
13. Poizkusili smo še drug suhi vodni ekstrakt, ki smo ga prav tako dobili iz podjetja Tanin Sevnica d.d., le da je bil ta proizveden januarja 2010. **Zatehtali smo 5 g in ga raztopili v 250 mL vode. Iz vodne raztopine smo nato izvedli ekstrakcijo z etilacetatom**, in sicer smo uporabili enak volumen etilacetata kot je bilo vodne faze. Postopek smo ponovili trikrat. Vodno fazo smo nato zavrgli, organski fazi pa smo dodali sušilno sredstvo (toliko, da se ne kepi) in pustili mešati na magnetnem mešalu čez noč. Raztopino, ki smo jo mešali čez noč, smo nato uparevali na rotavaporju pri 50°C do volumna okoli 100 mL oz. do zamotnitve raztopine. Nato smo dodali trikratni prebitek heptana in nastala je lepa oborina. To oborino smo nato filtrirali pod znižanim tlakom in kar je ostalo na filtru smo s filtrom vred

prenesli v bučko ter odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C do konstantne mase. Ostanek na filtru je bil naš željen produkt.

14. Pri naslednjem postopku smo uporabili **200 g svežega spomladanskega lubja**, nabranega maja v okolici Kočevja. Lubje smo zdrobili, natehtali zahtevano količino in namakali **15 minut pri temperaturi 100°C**. Nato smo še vroče filtrirali. Za tem smo izvedli direktno ekstrakcijo z etilacetatom, in sicer z enako količino etilacetata kot smo imeli vodnega filtrata. Postopek smo ponovili trikrat. Vodno fazo smo zavrgli, organski fazi pa smo dodali sušilno sredstvo (natrijev sulfat), in sicer toliko, da se le-to več ni sprijemalo v kepe. Na magnetnem mešalu smo to organsko fazo potem mešali čez noč. Drugo jutro smo raztopino filtrirali, da smo odstranili sušilno sredstvo. Nato smo raztopino uparevali na rotavaporju do nastanka motne raztopine. Potem je sledilo obarjanje s trikratno količino heptana; nastali so kosmiči in lepo se je oborilo. Za tem smo nastalo oborino filtrirali pod znižanim tlakom, kar je ostalo na filtru smo s filtrom vred prenesli v bučko in odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C do konstantne mase. Ostanek na filtru je bil naš željen produkt.
15. Na koncu smo izvedli še poizkus primerjave kvalitete in izkoristka pri svežem (spomladanskem) ter starem (jesenskem) lubju. Zatehtali smo po **100 g starega in svežega lubja ter oboje namakali 15 min pri temperaturi 100°C**. Nato smo še vroče filtrirali. Za tem smo izvedli direktno ekstrakcijo z etilacetatom, in sicer z enako količino etilacetata kot smo imeli vodnega filtrata. Postopek smo ponovili trikrat. Vodno fazo smo zavrgli, organski fazi pa smo dodali sušilno sredstvo (natrijev sulfat), in sicer toliko, da se to ni več sprijemalo v kepe. Na magnetnem mešalu smo to organsko fazo potem mešali čez noč. Drugo jutro smo raztopino filtrirali, da smo odstranili sušilno sredstvo. Nato smo odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C do količine okoli 100 mL, oziroma do nastanka motne raztopine. Potem je sledilo obarjanje s trikratno količino heptana; nastali so kosmiči in lepo se je oborilo. Za tem smo filtrirali pod znižanim tlakom, kar je ostalo na filtru smo s filtrom vred prenesli v bučko in odparili topilo z rotavaporjem pri 50°C do konstantne mase. Ostanek na filtru je bil naš željen produkt.

3. DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI POLIFENOLNIH SPOJIN Z DPPH METODO

Priprava reagenta:

- referenčno raztopino DPPH smo pripravili tako, da smo zatehtali 4 mg reagenta DPPH in ga raztopili v 100 mL metanola. Ker pa raztopina ni stabilna na svetlobi, smo bučko shranili na temno ali jo zavili v aluminijevo folijo. Za vsak poskus smo pripravili novo, svežo raztopino.

Priprava vzorcev:

- raztopine vzorcev smo pripravili tako, da smo natehtali 15 mg vzorca ter ga raztopili v 100 mL prečiščene vode.

Priprava vzorčnih raztopin:

- k 4,5 mL referenčne raztopine DPPH smo dodali 180 μ L predhodno razredčenih vzorcev (raztopine vzorcev). Za pripravo slepe raztopine smo referenčni raztopini DPPH dodali 180 μ L prečiščene vode. Tako pripravljene raztopine smo premešali ter pustili stati 30 minut. Nato smo izmerili absorbanco pri 517 nm.

AOP (antioksidacijski potencial) smo nato izračunali iz razlike absorbanco med slepo raztopino in raztopino z vzorcem. Bolj kot se je absorbanca zmanjšala, večji antioksidacijski potencial je imel vzorec. Porabljene mole DPPH v vzorcu smo izračunali iz Beer-Lambertovega zakona:

$$\Delta A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

$$c = \frac{\Delta A}{\varepsilon \cdot l}$$

ΔA – razlika absorbanco med referenčno raztopino in raztopino z vzorcem

ε – DPPH-ja pri 517 nm je 12000 L/mol·cm

c – koncentracija nastalega DPPH₂

l – dolžina poti svetlobe skozi vzorec (1 cm)

$$n = c \cdot V_{\text{razt.}}$$

$$AOP \left(\text{mol} \frac{\text{DPPH}}{\text{L}} \right) = \frac{1\text{L} \cdot n}{V_{\text{vzorca}}}$$

$$AOP \left(\frac{\text{mol}}{\text{g}} \right) = \frac{1000 \cdot 100 \cdot n}{m_{\text{zatehke}} \cdot V_{\text{vzorca}}}$$

4. DOLOČANJE VSEBNOSTI POLIFENOLNIH SPOJIN S FOLIN-CIOCALTEAU-JEVO METODO

Prav tako kot antioksidacijski potencial smo tudi vsebnost polifenolnih spojin določali spektrometrijsko. Po vrednosti smo med seboj primerjali piknogenol in izvlečke iz lubja obmorskega bora ter navadne jelke.

Priprava reagentov:

- FC reagent (Fluka) je bil že pripravljen za uporabo,
- 20% raztopina natrijevega karbonata (Na_2CO_3): 40 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ smo raztopili v 150 mL vode in nato dopolnili do 200 mL. Rok uporabe tako pripravljenega reagenta je bil 1 mesec.

Priprava vzorcev:

- 1,5 mg vzorca smo razredčili v merilni bučki do 10 mL z destilirano vodo. Nato smo iz te raztopine odpipetirali 1,5 mL v novo 10 mL merilno bučko in razredčili do oznake z 0,005 M H_2SO_4

Priprava vzorčnih raztopin:

- V 10 mL bučke smo odpipetirali 0,5 mL po prej opisanem postopku pripravljenega vzorca, dodali 0,5 mL FC reagenta in 3 mL prečiščene vode. Nato smo počakali 4 minute, po tem pa smo dodali še 2 mL 20% raztopine Na_2CO_3 in dopolnili do 10 mL s prečiščeno vodo.

Po 90 minutah smo nato izmerili absorbanco pri valovni dolžini 755 nm.

Vsebnost polifenolov smo izrazili kot koncentracijo galne kisline:

$$c(\text{vzorec}) = \frac{A(\text{vzorec})}{A(\text{galna kislina})} \times c(\text{galna kislina})$$

$$\text{masa polifenolov} = c(\text{vzorec}) \times 100 \text{ mL}$$

$$\text{delež polifenolov} = \frac{\text{masa polifenolov}}{15 \text{ mg}}$$

5. ANALIZNA HPLC

Pri HPLC analizi smo uporabili naslednjo metodo:

Volumen injiciranja vzorcev: 20 μL

Mobilna faza A: voda + 0,1% TFA

Mobilna faza B: MeCN + 0,1% TFA

Gradient:

- 0-1 min 5% B
- 1-10 min od 5% B do 30% B
- 10-10,01 min od 30% B do 100% B
- 10,01-12 min 100% B
- 12-12,01 min od 100% B do 5% B
- 12,01-15 min 5% B

Pretok: 2 mL/min

Detekcija: 280 nm

Temperatura kolone in detektorja: 40°C

V. REZULTATI

Izvlečke iz lubja navadne jelke in obmorskega bora smo pripravili na več načinov, ki so opisani v poglavju eksperimentalno delo. Zbrani rezultati so predstavljeni v spodnjih preglednicah (**Preglednica III – Preglednica VII**).

1. PRIPRAVA IZVLEČKA IZ LUBJA OBMORSKEGA BORA

1. m (produkta) = 655,5 mg (izplen 0,65%)
2. m (produkta) = 2,6300 g (izplen 2,63%)

Preglednica III: Absorbanca, razlika absorbanc in antioksidativni potencial v našem ter originalnem piknogenolu.

vzorec	absorbanca	razlika absorbanc	antioksidativni potencial	antioksidativni potencial glede na piknogenol
slepi vzorec	0,979			
piknogenol 70°C	0,292	0,687	0,00992	1,63
piknogenol 100°C	0,338	0,641	0,00926	1,52
Piknogenol®	0,557	0,422	0,00610	1,00

2. PRIPRAVA IZVLEČKA IZ LUBJA NAVADNE JELKE

Preglednica IV: Masa produkta ter izplen pri izvlečkih iz jelkega lubja, pridobljenih po različnih postopkih.

vzorec	masa produkta (mg)	izplen (%)	izplen glede na mleto lubje kot izhodni material
1. suhi vodni ekstrakt	2175,4	4,4	
usedlina po dodatku acetona	2023,7		
supernatant po dodatku acetona	75,4		
supernatant po dodatku acetona + pentana	32,4		
končni produkt	35,7	0,07	0,07
2.	129,4	0,26	0,26
3.	404,0	0,40	0,40
4. suhi vodni izvleček	2895,8	5,8	/
aceton/voda izvleček	zanemarljivo malo	/	/
acetonski/voda izvleček (iz Taninovega ekstrakta)	zanemarljivo malo	/	/
5. etilacetatni izvleček	240,7	4,8	0,24
6. acetonski izvleček	40,0	0,80	0,040
7. etanolni izvleček	342,6	6,9	0,34

8.			
etilacetatni izvleček	zanemarljivo malo	/	/
metilacetatni izvleček	zanemarljivo malo	/	/
9.	/	/	/
10.	437,7	8,8	0,437
11.			
etanolni izvleček	18,5	0,37	0,018
metanolni izvleček	/	/	/
12.	/	/	/
13.	52,0	1,0	0,052
14.	982,0	0,49	0,49
15.			
produkt iz pomladanskega lubja	284,6	0,28	0,28
produkt iz jesenskega lubja	61,9	0,062	0,062

Opomba: Pri izračunu izplena glede na mleto lubje kot izhodni material smo predpostavili, da iz 100 g mletega lubja dobimo 5 g suhega vodnega ekstrakta.

3. DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI POLIFENOLNIH SPOJIN Z DPPH METODO

Preglednica V: Absorbance pri merjenju z DPPH metodo ter AOP (antioksidacijski potencial).

vzorec	absorbanca	razlika absorbanc	AOP (mol/g)	AOP glede na piknogenol
1.				
slepi vzorec	0,957			
suhi vodni ekstrakt	0,704	0,253	0,00365	0,58
usedlina po dodatku acetona	0,702	0,255	0,00368	0,58
supernatant po dodatku acetona	0,794	0,163	0,00235	0,37
supernatant po aceton + pentan	0,823	0,134	0,00194	0,31
končni produkt	0,740	0,217	0,00313	0,50
2.	/	/	/	
3.				
slepi vzorec	0,993			
produkt	0,636	0,357	0,00516	0,82
4.	/	/	/	/
5.				
slepi vzorec	0,946			
produkt	0,668	0,278	0,00402	0,64
6.	/	/	/	/
7.				
slepi vzorec	0,966			
produkt	0,735	0,190	0,00274	0,39
piknogenol	0,490	0,476	0,00688	1,00
8.	/	/	/	
9.	/	/	/	

10.				
slepi vzorec	0,966			
produkt	0,714	0,252	0,00364	0,53
abigenol iz lubja po pat. postopku	0,505	0,461	0,00666	0,97
abigenol iz suhega ekstr. po pat. postopku (vzorec št. 5)	0,616	0,350	0,00506	0,74
piknogenol	0,490	0,476	0,00688	1,00
11.	/	/	/	/
12.	/	/	/	/
13.				
slepi vzorec	0,923			
suhi vodni ekstrakt	0,729	0,194	0,00280	0,53
produkt	0,815	0,108	0,00156	0,29
piknogenol	0,556	0,367	0,00530	1,00
abigenol	0,501	0,422	0,00610	1,15
14.				
slepi vzorec	0,928			
produkt	0,445	0,483	0,00698	1,00
piknogenol	0,446	0,482	0,00696	1,00
15.				
slepi vzorec	1,021			
produkt iz pomladanskega lubja	0,729	0,292	0,00422	0,67
produkt iz jesenskega lubja	0,857	0,164	0,00237	0,38

Opomba: Ker pri vseh poskusih nismo izvajali metode DPPH za piknogenol, smo pri teh poskusih za izračune uporabili povprečje meritev AOP-ja za piknogenol, ki znaša 0,00631 mol/g.

4. DOLOČANJE VSEBNOSTI POLIFENOLNIH SPOJIN S FOLIN-CIOCALTEAU-JEVO METODO

Preglednica VI: Absorbance, dobljene pri merjenjih s Folin-Ciocalteau-jevo metodo ter vsebnost polifenolov.

vzorec	absorbanca	razlika absorbanc	vsebnost polifenolov, izraženih kot galna kislina (mg/mL)
1.			
slepi vzorec	0,000		
suhi vodni ekstrakt	0,006	0,006	0,00121
usedlina po dodatku acetona	0,016	0,016	0,00324
supernatant po dodatku acetona	0,008	0,008	0,00162
supernatant po aceton + pentan	0,009	0,009	0,00182
končni produkt	0,017	0,017	0,00344
2.	/	/	/
3.			
slepi vzorec	0,000		
produkt	0,016	0,016	0,00329
4.	/	/	/
5.			
slepi vzorec	0,000		
produkt	0,324	0,324	0,06559
6.	/	/	/
7.			
slepi vzorec	0,000	0,000	
produkt	0,184	0,184	0,03725
8.	/	/	/
9.			

10.			
slepi vzorec	0,000		
produkt	0,190	0,190	0,03846
piknogenol	0,370	0,370	0,07490
abigenol iz lubja po pat.postopku	0,387	0,387	0,07834
abigenol iz suhega ekstr. po pat. postopku (vzorec št. 5)	0,317	0,317	0,06417
galna kislina	0,741	0,741	/
11.	/	/	/
12.	/	/	/
13.	/	/	/
14.	/	/	/
15.	/	/	/

Preglednica VII: Masa in delež polifenolov.

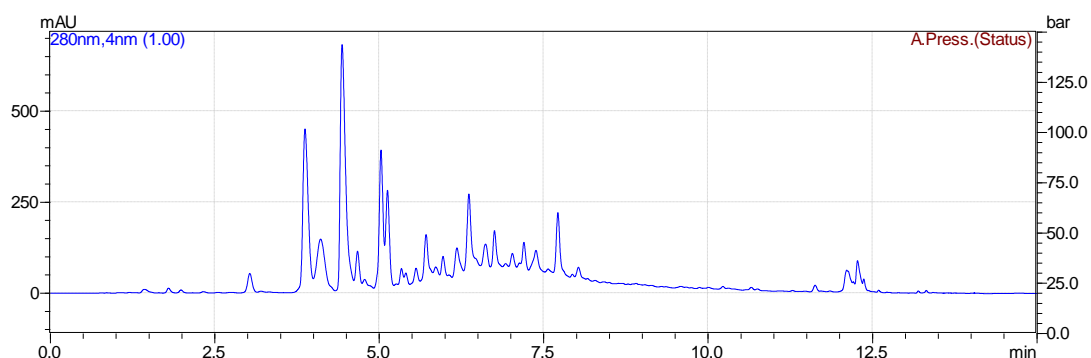
vzorec	masa polifenolov (mg)	delež polifenolov (%)	vsebnost polifenolov glede na piknogenol
1.			
suhi vodni ekstrakt	0,121	0,8	0,016
usedlina po dodatku acetona	0,324	2,2	0,043
supernatant po dodatku acetona	0,162	1,1	0,022
supernatant po aceton + pentan	0,182	1,2	0,0243
končni produkt	0,344	2,3	0,046
2.	/	/	/
3.	0,329	2,2	0,044
4.	/	/	/
5.	6,559	43,7	0,876
6.	/	/	/
7.	3,725	24,8	0,497
8.	/	/	/

9.	/	/	/
10.			
produkt	3,846	25,6	0,513
piknogenol	7,490	49,9	1,000
abigenol iz lubja po pat.postopku	7,834	52,2	1,046
abigenol iz suhega ekstr. po pat. postopku	6,417	42,8	0,857
11.	/	/	/
12.	/	/	/
13.	/	/	/
14.	/	/	/
15.	/	/	/

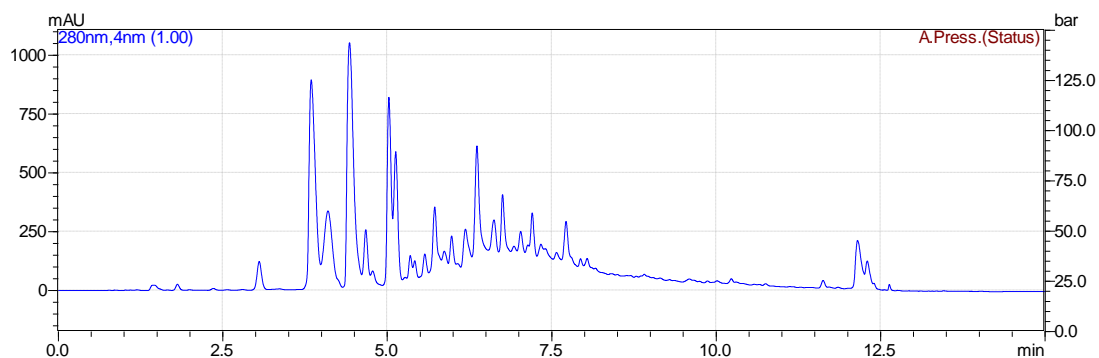
5. ANALIZNA HPLC

Naslednje slike (**Slika 15** – **Slika 65**) prikazujejo kromatograme izhodnih materialov in izvlečkov ter vmesnih stopenj pri pripravi izvlečkov iz lubja jelke in bora.

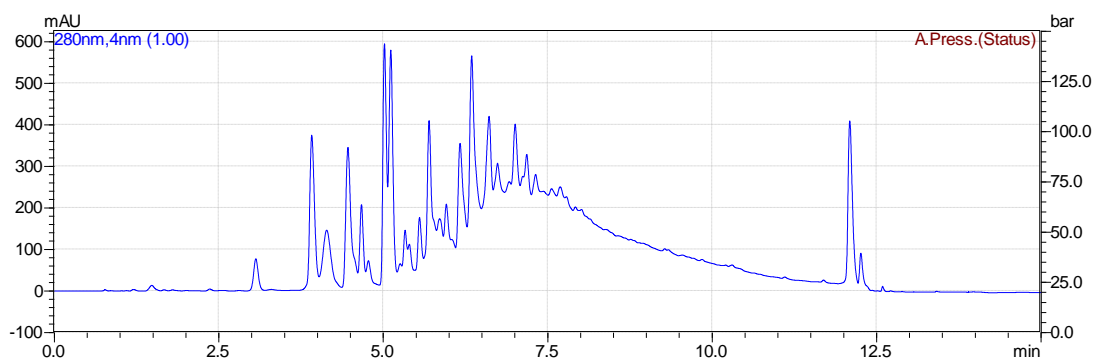
5.1. Kromatogrami izvlečkov iz lubja bora



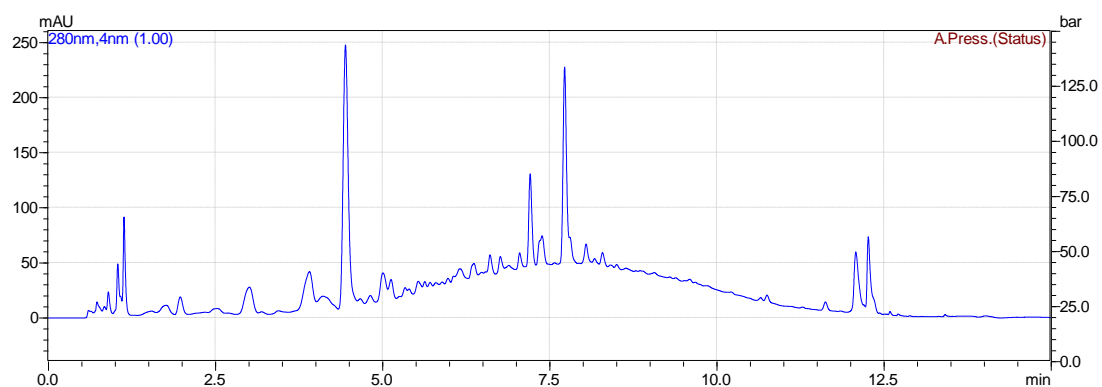
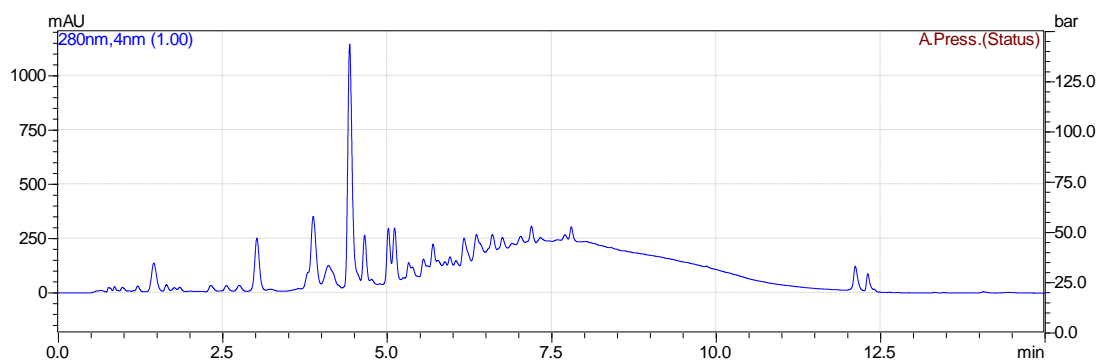
Slika 15: Etilacetatni ekstrakt.



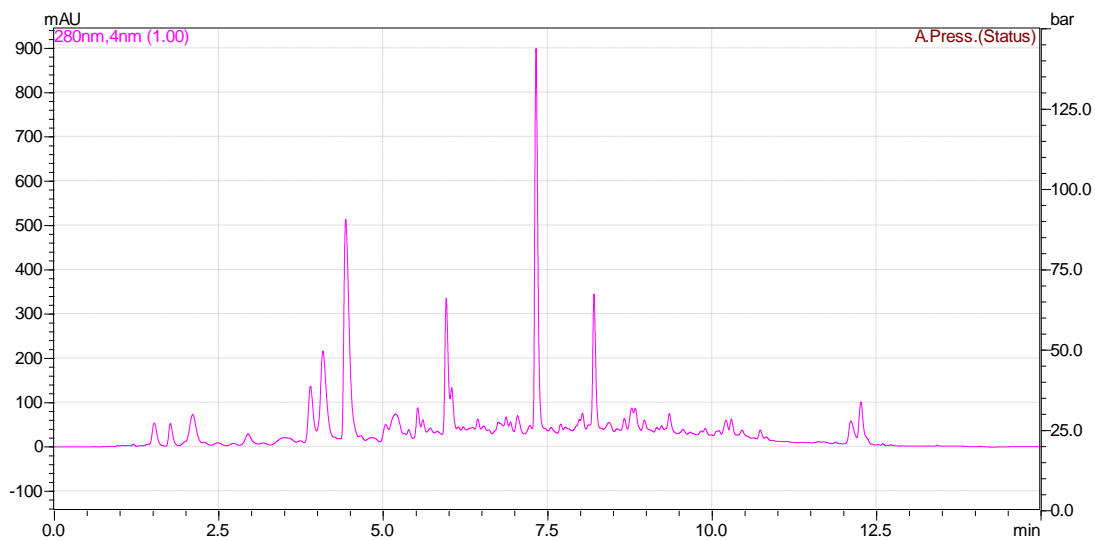
Slika 16: Piknogenol, pridobljen po patentnem postopku (15 min pri 100°C) (vzorec št. 2).



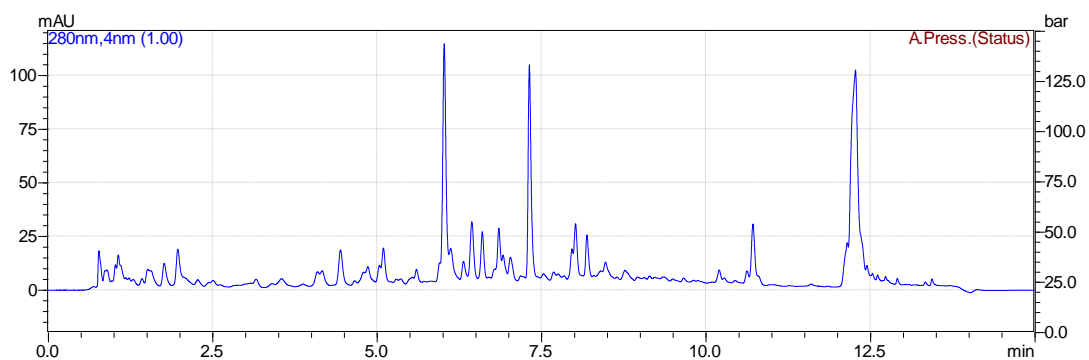
Slika 17: Piknogenol, pridobljen po dvournem maceriranju pri 70°C (vzorec št. 1).

**Slika 18: Pycnogenol®.****Slika 19: Vodni ekstrakt iz lubja bora.**

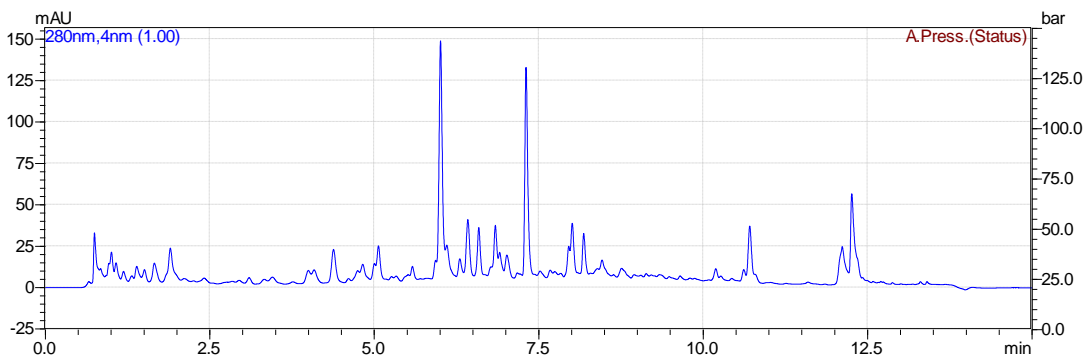
5.2. Kromatogrami izvlečkov iz lubja jelke



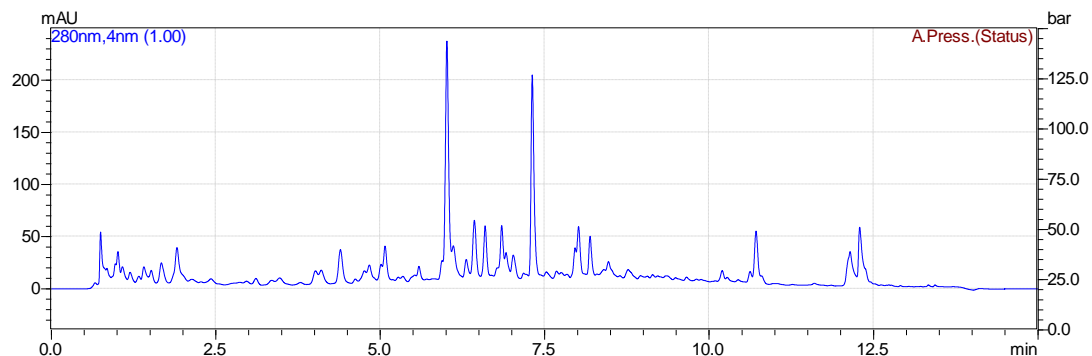
Slika 20: Abigenol (vzorec iz arhiva).



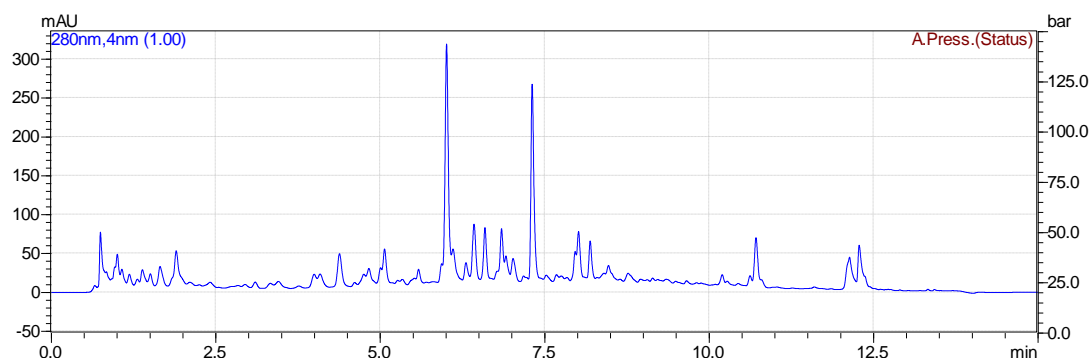
Slika 21: 5% etanol v acetonu (vzorec št. 10).



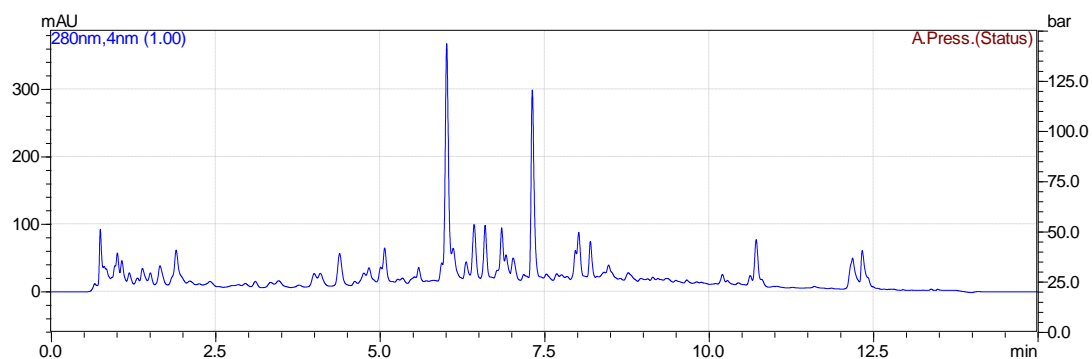
Slika 22: 10% etanol v acetonu (vzorec št. 10).



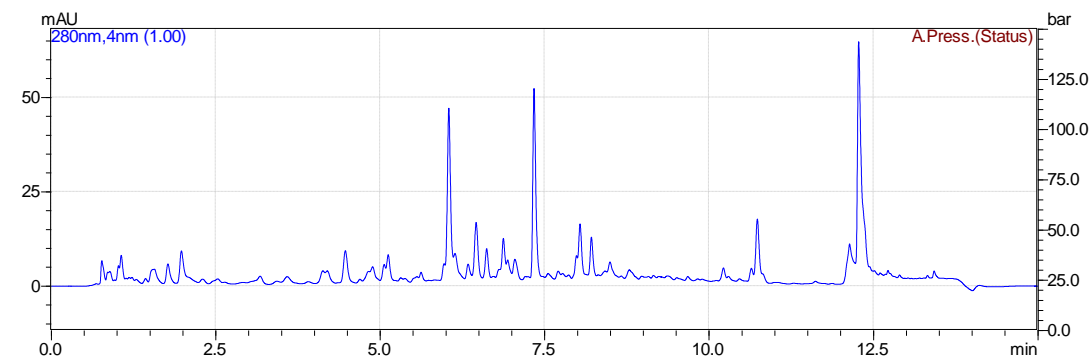
Slika 23: 15% etanol v acetonu (vzorec št. 10).



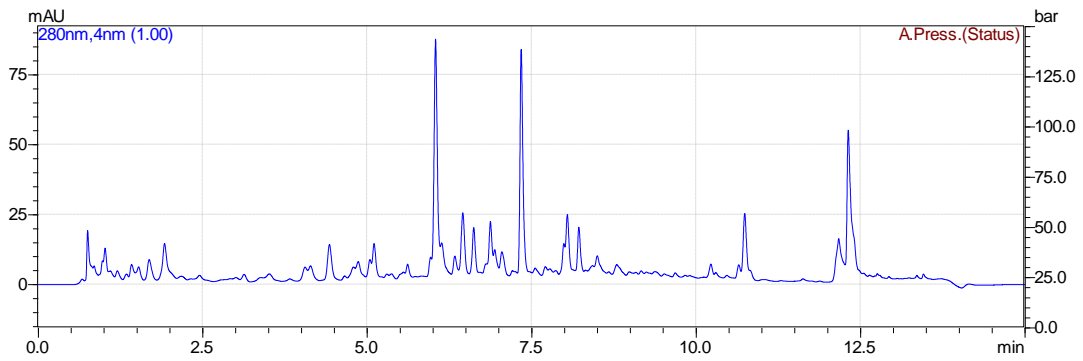
Slika 24: 20% etanol v acetonu (vzorec št. 10).



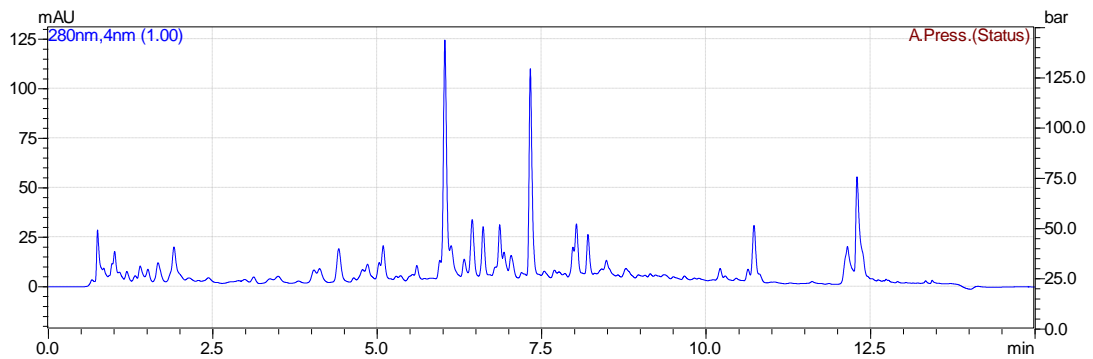
Slika 25: 25% etanol v acetonu (vzorec št. 10).



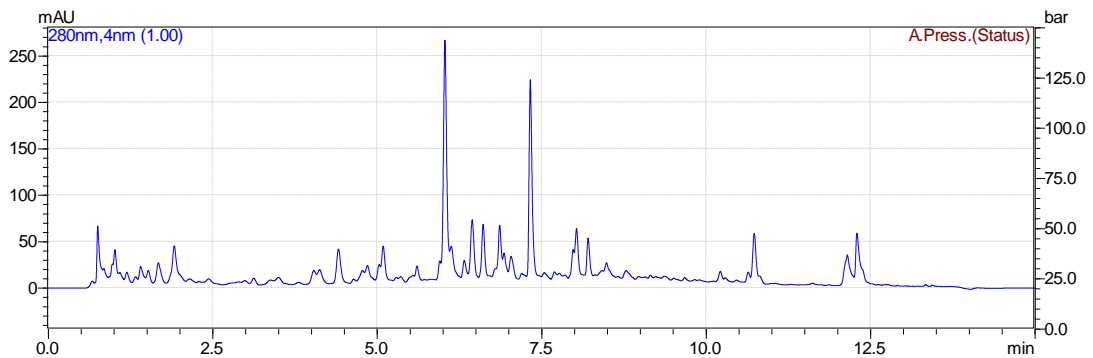
Slika 26: 10% etanol v etilacetatu (vzorec št. 11).



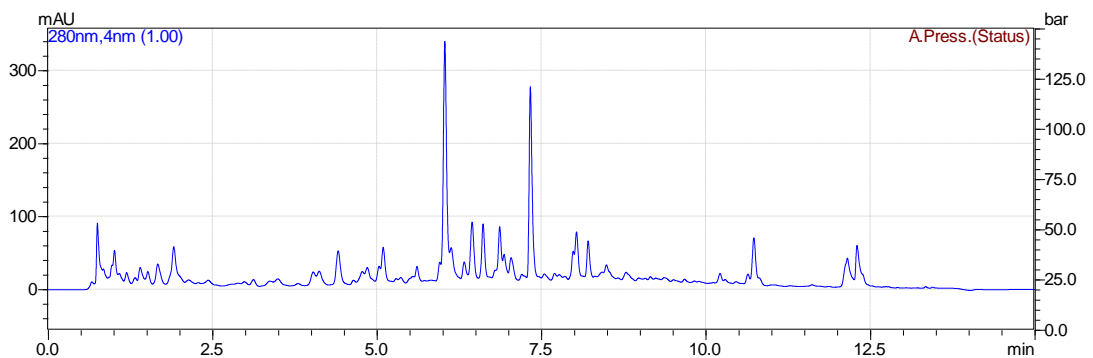
Slika 27: 20% etanol v etilacetatu (vzorec št. 11).



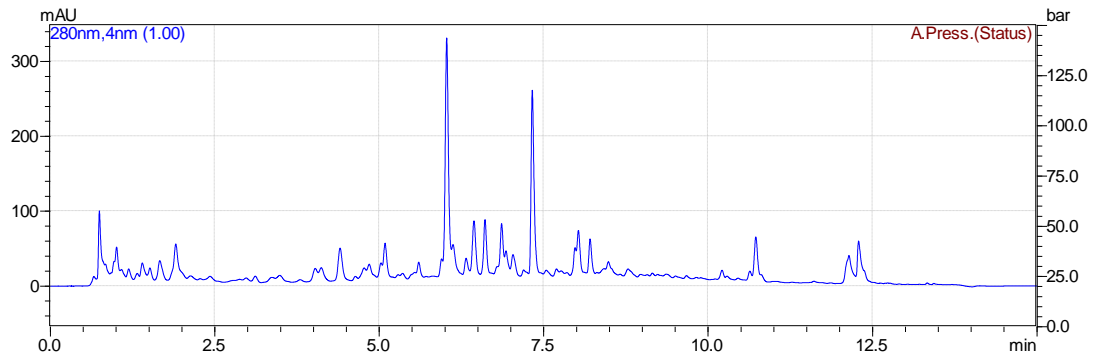
Slika 28: 30% etanol v etilacetatu (vzorec št. 11).



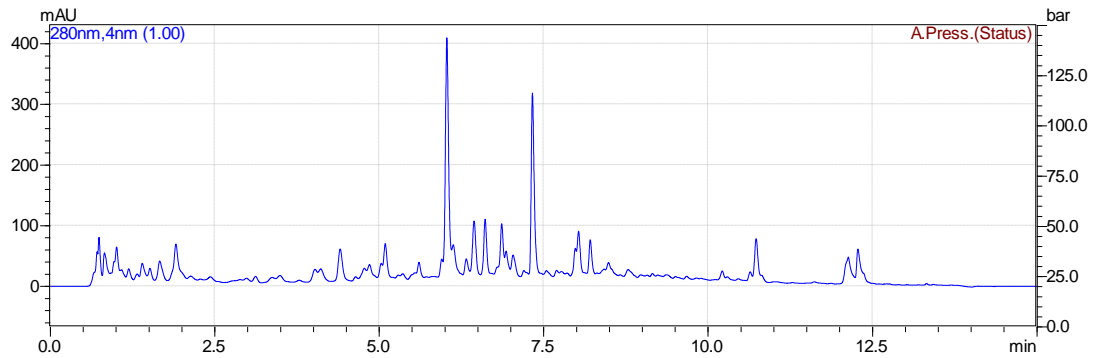
Slika 29: 40% etanol v etilacetatu (vzorec št. 11).



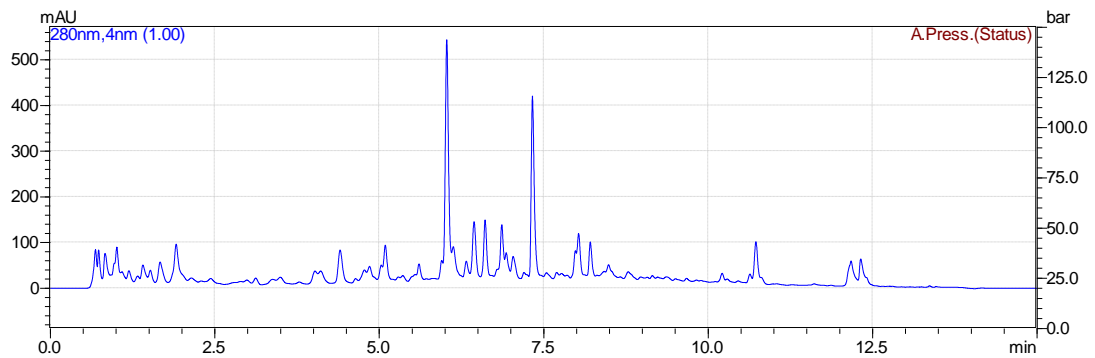
Slika 30: 50% etanol v etilacetatu (vzorec št. 11).



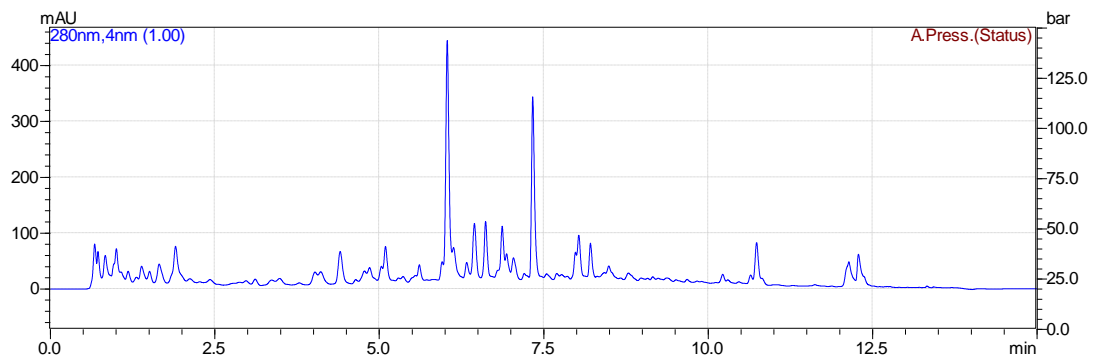
Slika 31: 60% etanol v etilacetatu (vzorec št. 11).



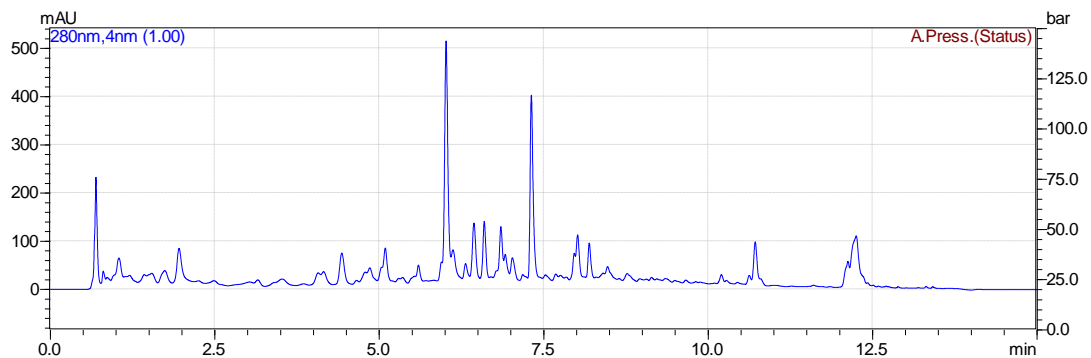
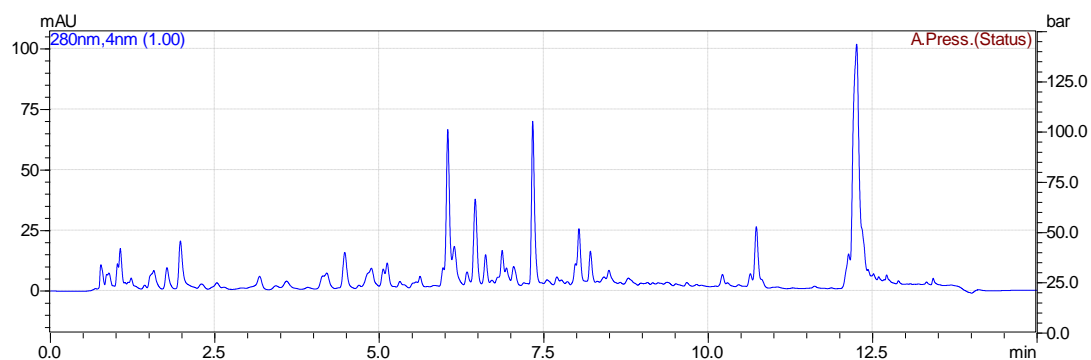
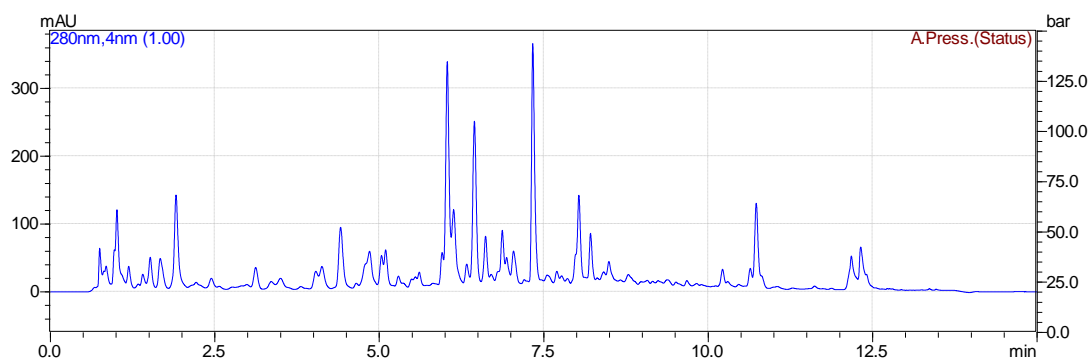
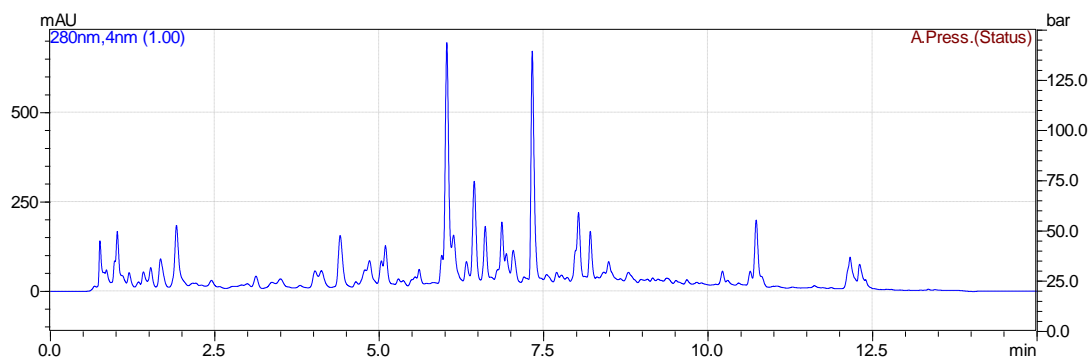
Slika 32: 70% etanol v etilacetatu (vzorec št. 11).

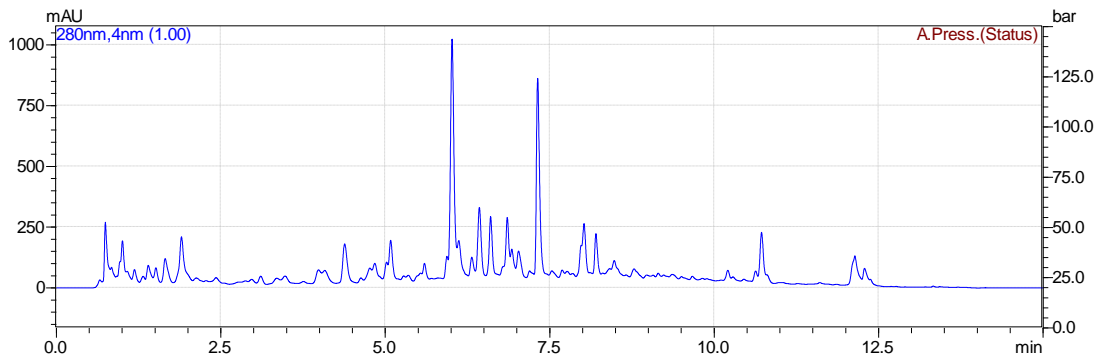


Slika 33: 80% etanol v etilacetatu (vzorec št. 11).

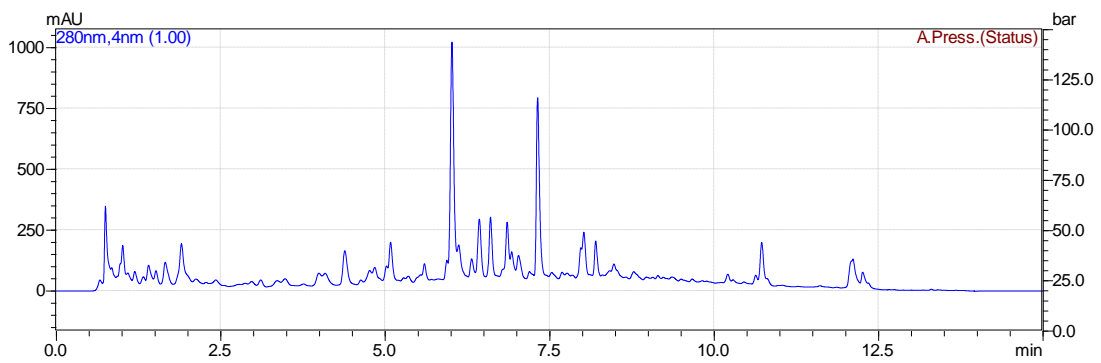


Slika 34: 90% etanol v etilacetatu (vzorec št. 11).

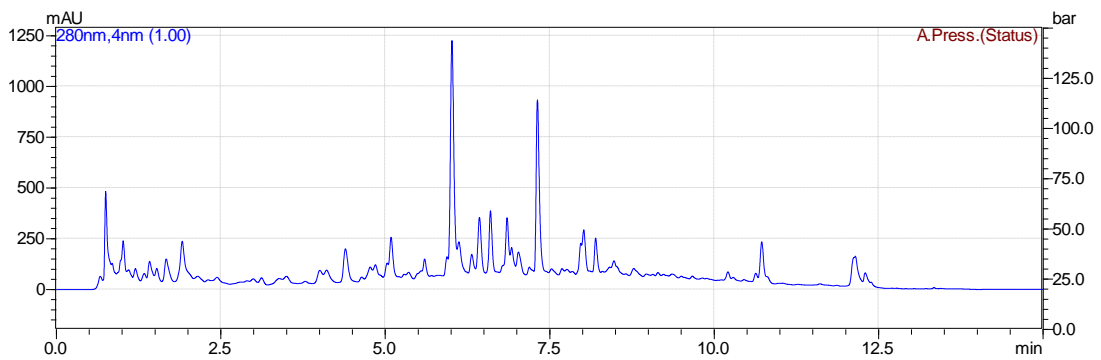
**Slika 35:** 100% etanol (vzorec št. 11).**Slika 36:** 10% metanol v etilacetatu (vzorec št. 11).**Slika 37:** 20% metanol v etilacetatu (vzorec št. 11).**Slika 38:** 30% metanol v etilacetatu (vzorec št. 11).



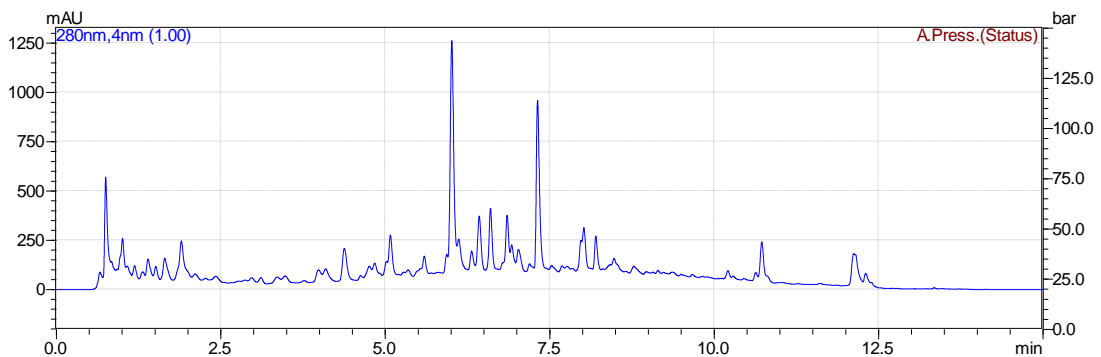
Slika 39: 40% metanol v etilacetatu (vzorec št. 11).



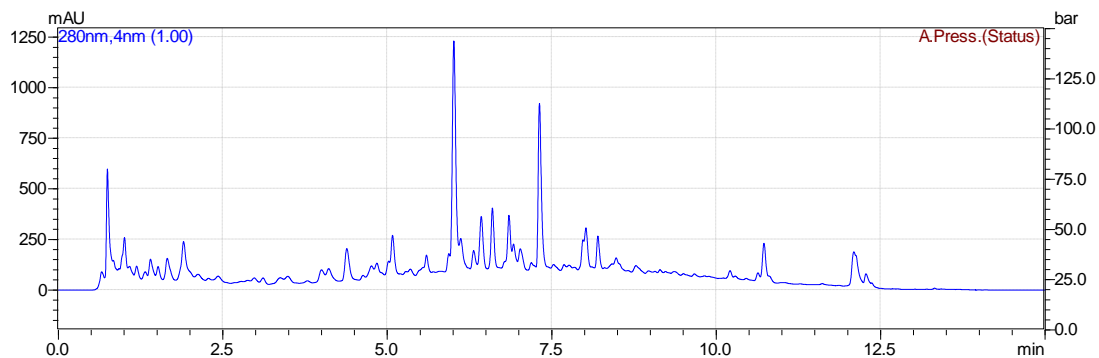
Slika 40: 50% metanol v etilacetatu (vzorec št. 11) .



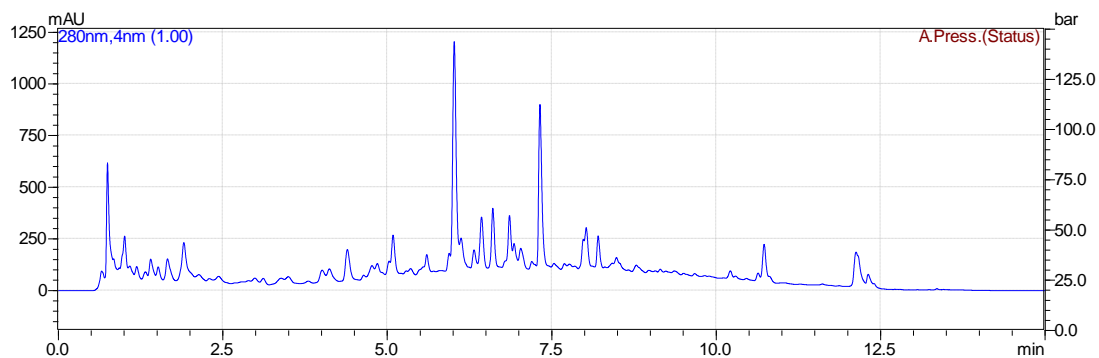
Slika 41: 60% metanol v etilacetatu (vzorec št. 11).



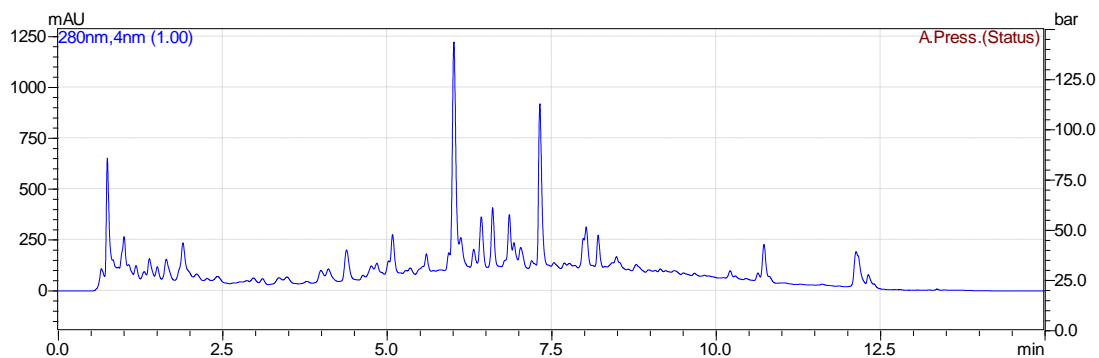
Slika 42: 70% metanol v etilacetatu (vzorec št. 11).



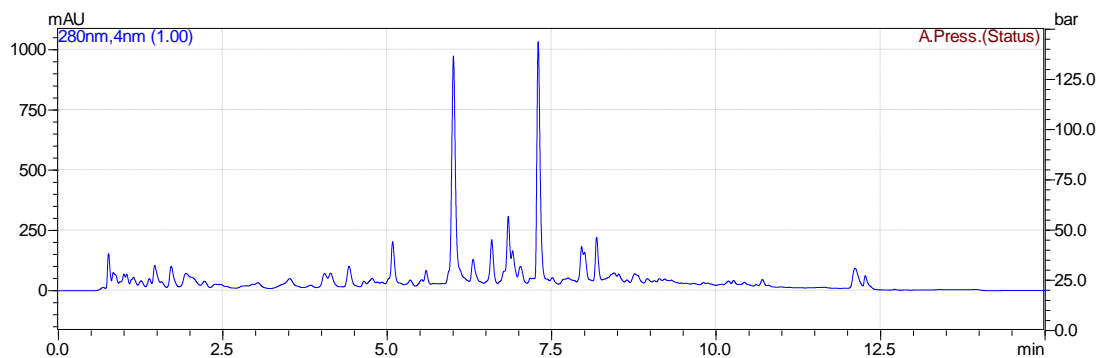
Slika 43: 80% metanol v etilacetatu (vzorec št. 11).



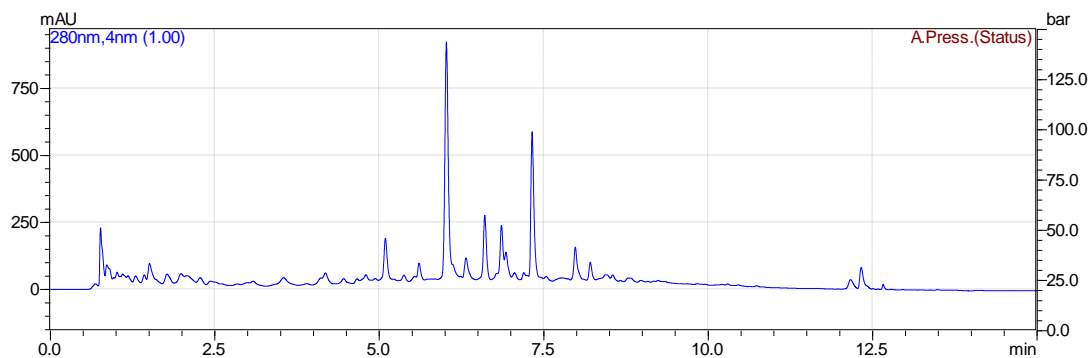
Slika 44: 90% metanol v etilacetatu (vzorec št. 11).



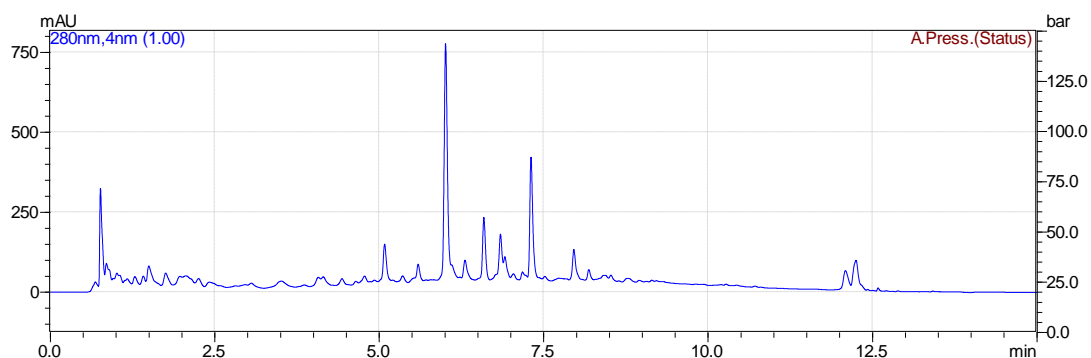
Slika 45: 100% metanol (vzorec št. 11).



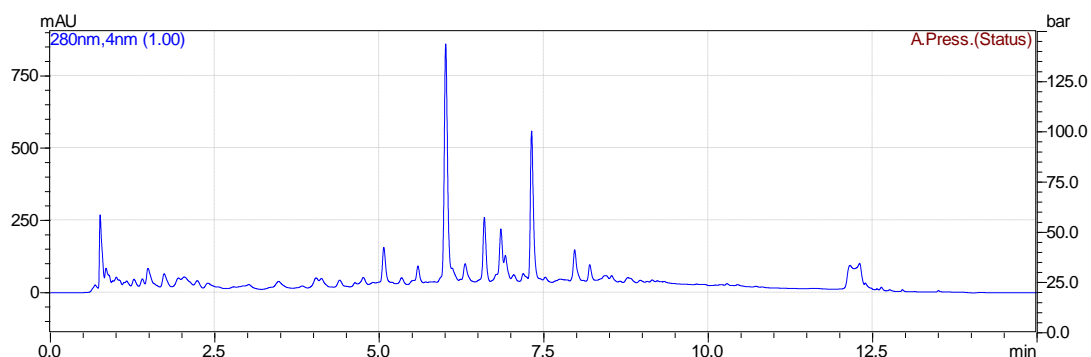
Slika 46: Abigenol 10% etanol v etilacetatu (vzorec št. 11).



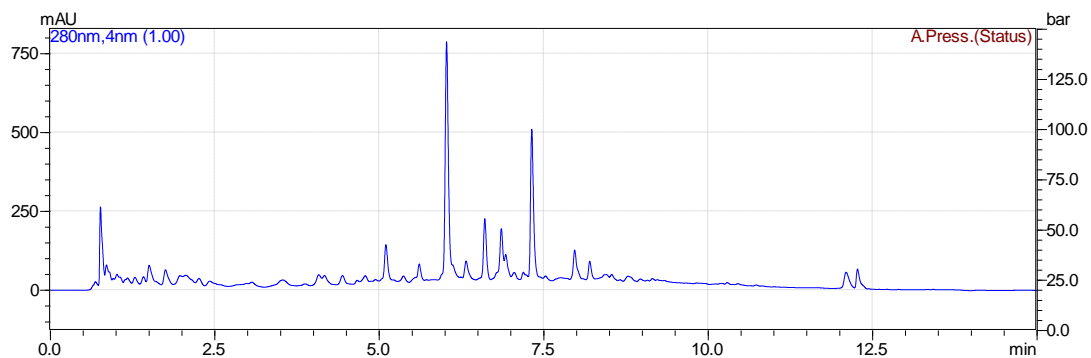
Slika 47: Abigenol 20% etanol v etilacetatu (vzorec št. 11).



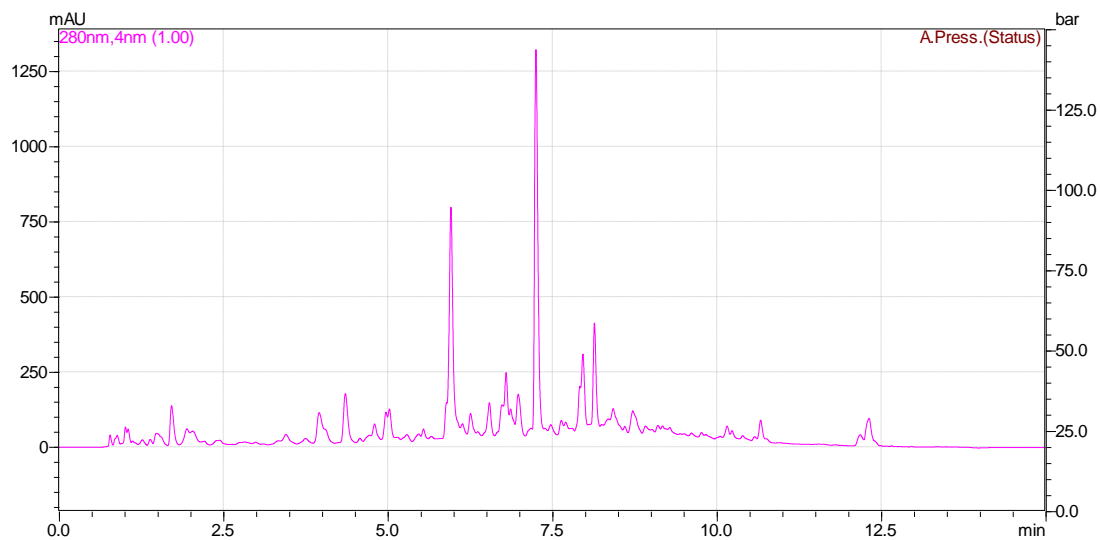
Slika 48: Abigenol 100% etanol (vzorec št. 7).



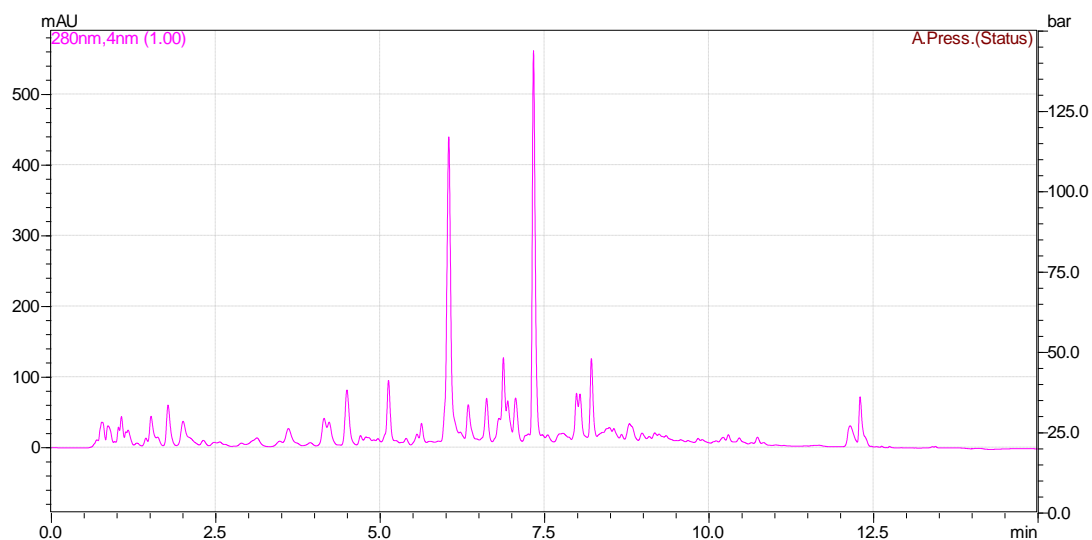
Slika 49: Abigenol etanol:acetone = 1:3 (vzorec št. 10).



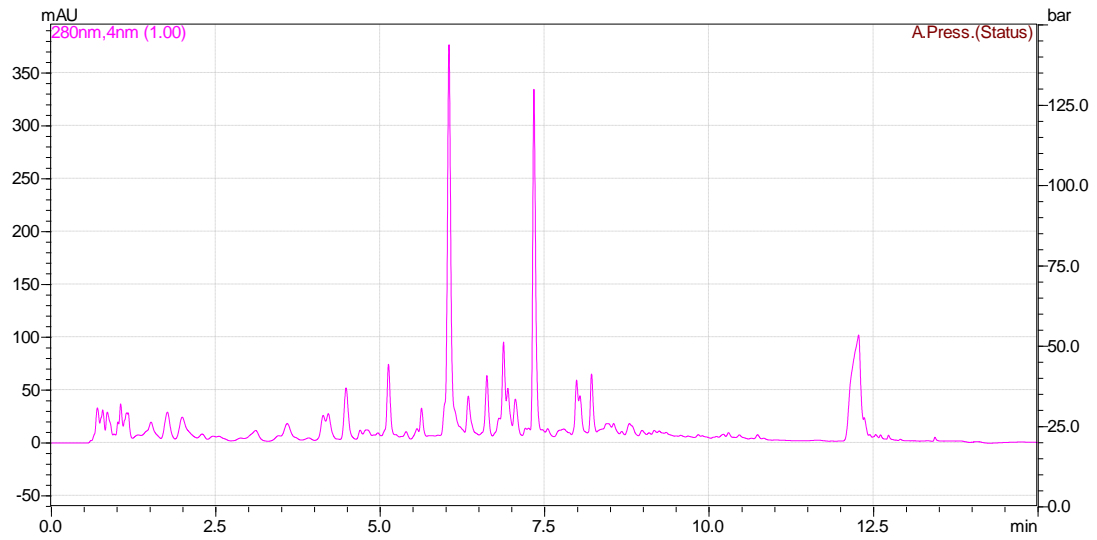
Slika 50: Abigenol etanol:acetone = 1:5 (vzorec št. 10).



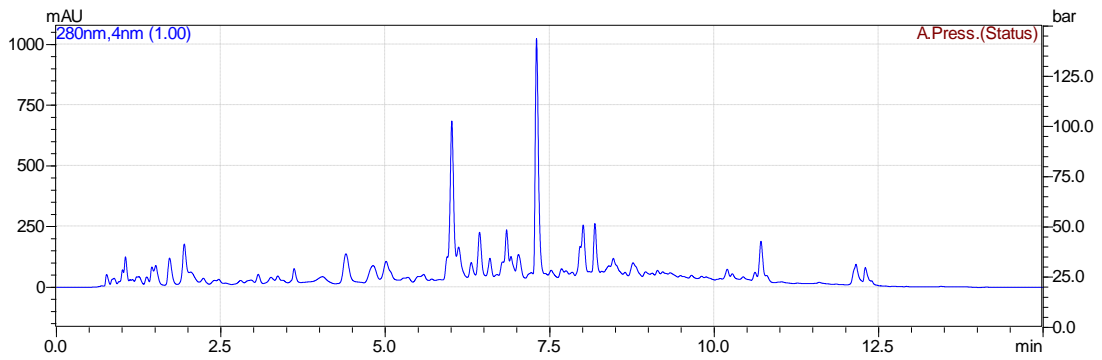
Slika 51: Abigenol po patentu (arhiv).



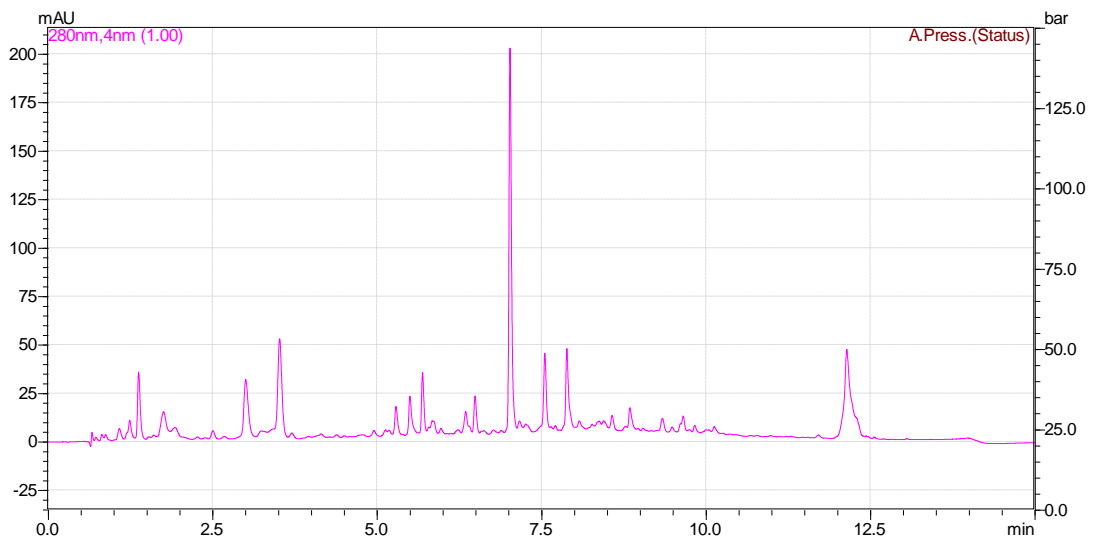
Slika 52: Abigenol trdno-tekoče 1. ekstrakcija (vzorec št. 9).



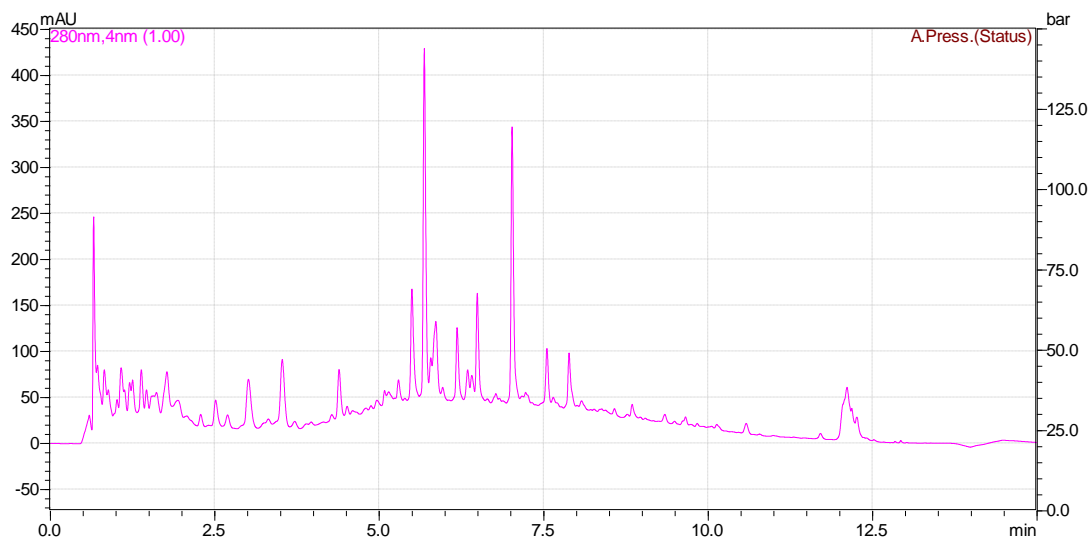
Slika 53: Abigenol trdno-tekoče 2. ekstrakcija (vzorec št. 9).



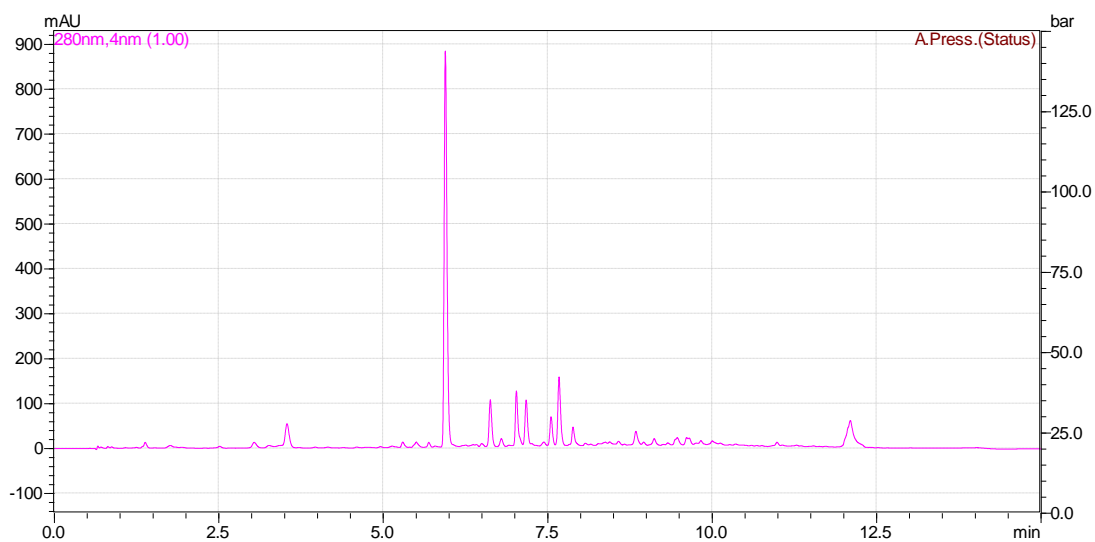
Slika 54: Etilacetatni ekstrakt po patentu (arhiv).



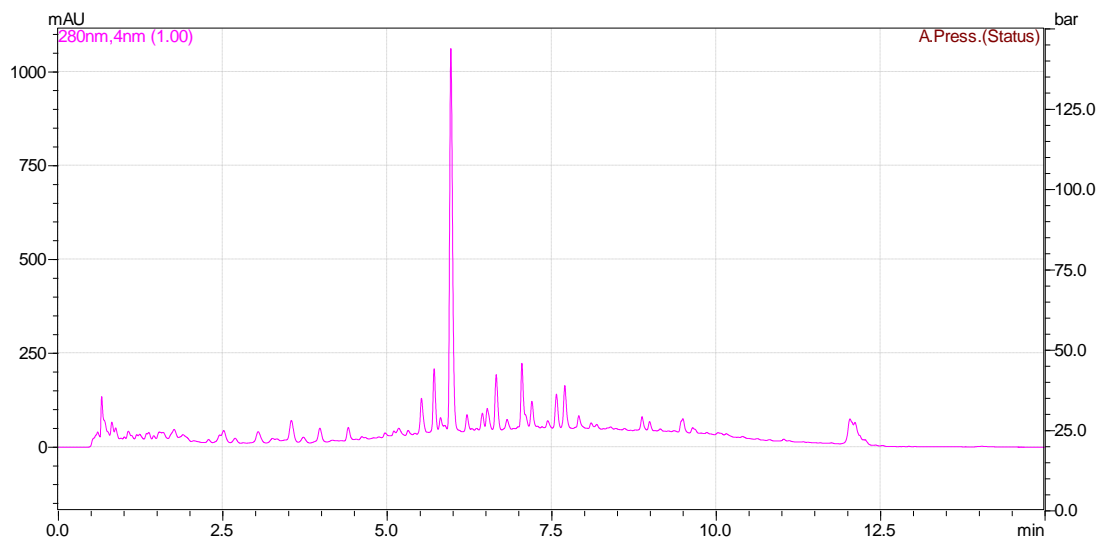
Slika 55: Abigenol FFA pomlad 2010 (vzorec št. 14).



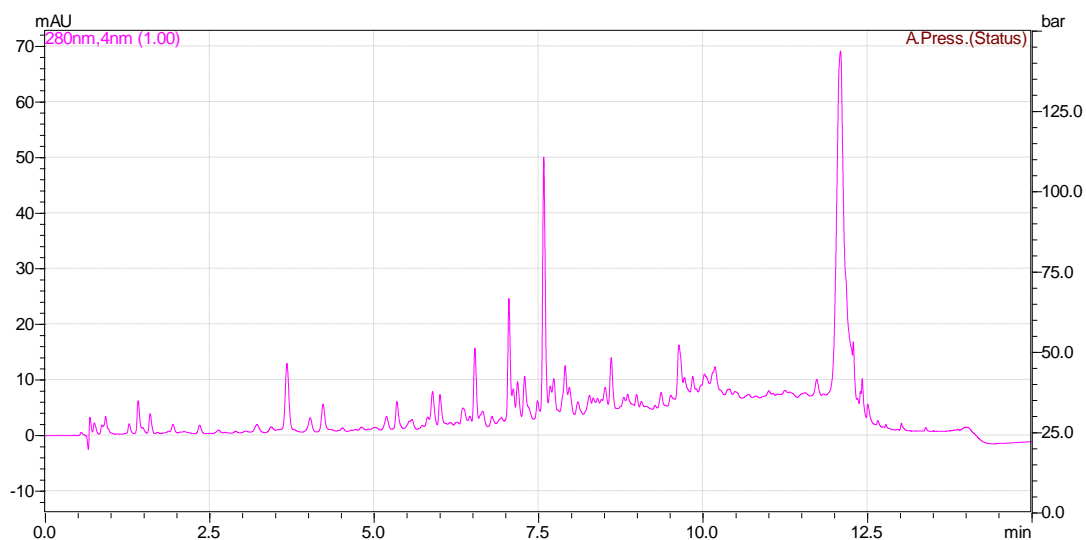
Slika 56: Lubje FFA pomlad 2010.



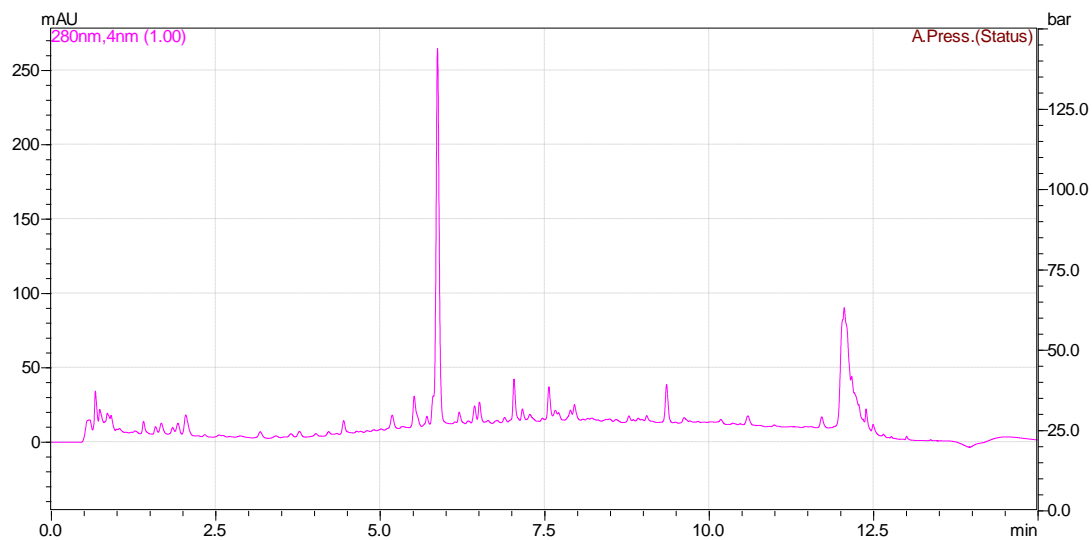
Slika 57: Abigenol iz podjetja Tanin Sevnica d.d., pomlad 2010



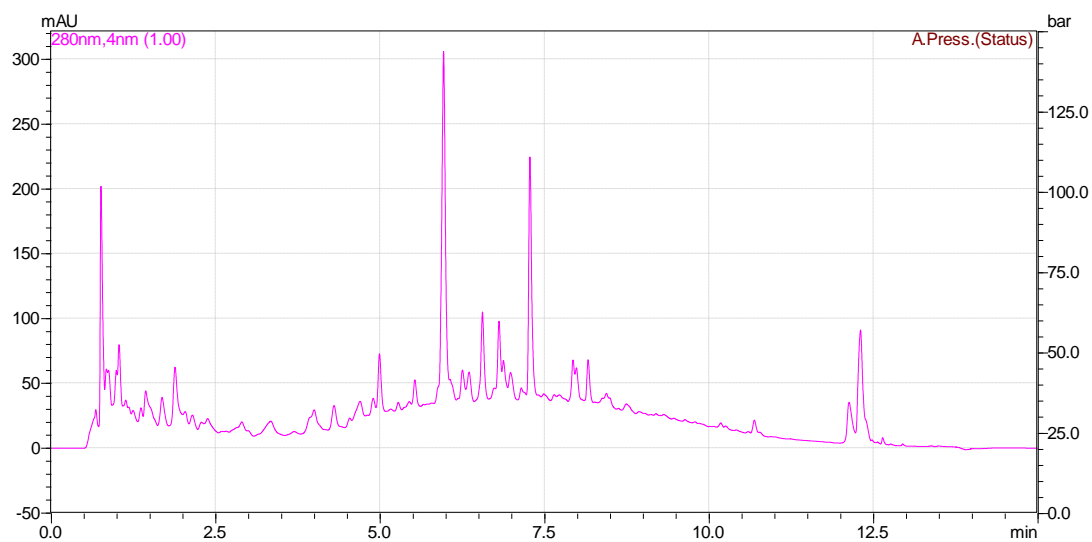
Slika 58: Lubje iz podjetja Tanin Sevnica d.d., pomlad 2010



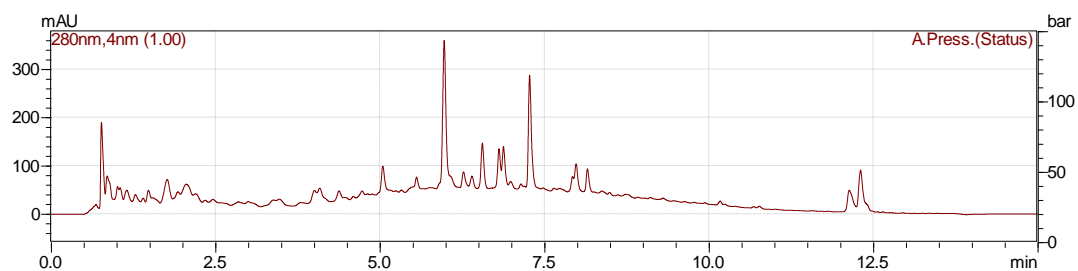
Slika 59: Abigenol iz podjetja Tanin Sevnica d.d., jesen 2009



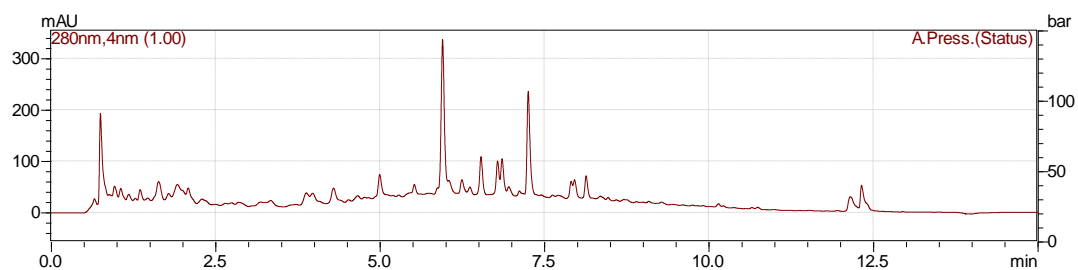
Slika 60: Lubje iz podjetja Tanin Sevnica d.d., jesen 2009



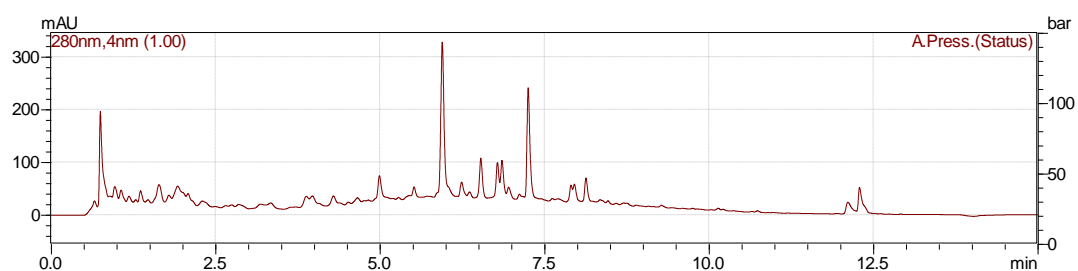
Slika 61: Suhi vodni ekstrakt iz podjetja Tanin Sevnica, d.d.



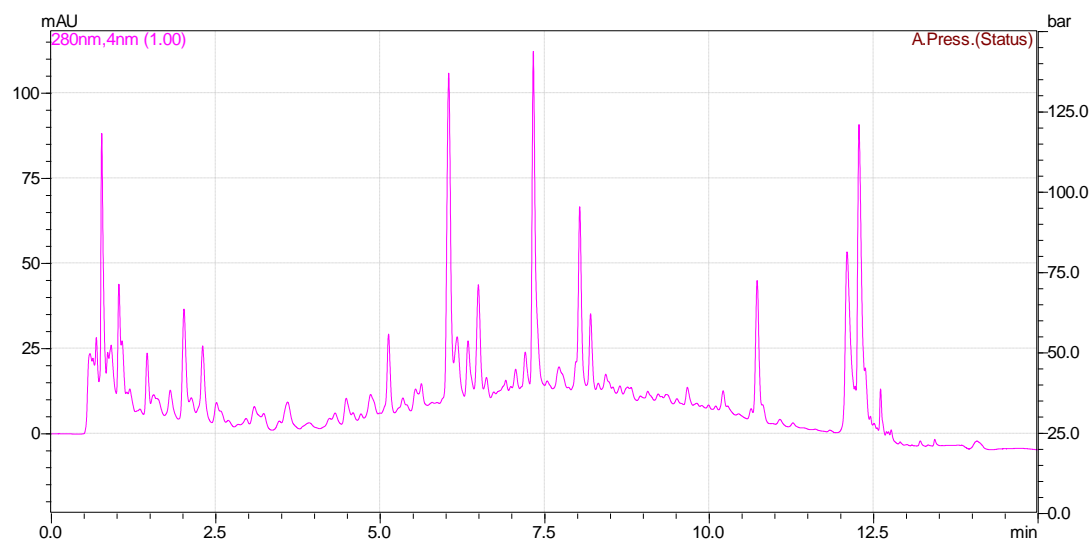
Slika 62: Suhi vodni ekstrakt FFA (vzorec št. 4).



Slika 63: Lubje, namakano eno uro pri 70°C.



Slika 64: Lubje, namakano dve uri pri 70°C.



Slika 65: Tekoči vodni ekstrakt iz Tanina Sevnica, d.d. (vzorec št. 12).

VI. RAZPRAVA

1. IZVLEČEK IZ LUBJA OBMORSKEGA BORA

Pri poskusih s skorjo navadnega bora smo opazili, da smo imeli večje težave z nastankom emulzije pri postopku ekstrakcije vodnega ekstrakta z etilacetatom v liju ločniku. To emulzijo smo nekako razbili s soljo (natrijevim kloridom) in s segrevanjem s sušilnikom za lase. V liju ločniku je ostalo nekaj snovi, podobne smoli. Opazili smo tudi veliko manjši izplen pri prvem postopku, in sicer pri dvournem namakanju pri temperaturi 70°C. Nasprotno pa smo dobili produkt brez težav pri drugem postopku, in sicer pri petnajst minutnem namakanju pri 100°C. Kot je zapisano v literaturi, lahko podaljšan kontaktni čas vpliva na inaktivacijo polifenolov, prav tako je višja temperatura, ki smo jo uporabili v drugem postopku ugodnejša, saj se pri višji temperaturi ekstrahira več polifenolov.

Iz rezultatov v tabeli vidimo, da ima izvleček iz lubja bora višjo antioksidativno aktivnost kot izvleček iz lubja jelke, prav tako pa ima tudi 1,5 krat višjo antioksidativno aktivnost kot originalni piknogenol.

2. IZVLEČKI IZ LUBJA NAVADNE JELKE

Poskus 1

Pri tem poskusu smo preizkušali topilo aceton, stehali in analizirali pa smo tudi vsebnost polifenolov ter antioksidativno aktivnost vsake frakcije pri postopku pridelave izvlečka. Pri samem postopku nismo imeli posebnih težav, nastala je bela kosmičasta oborina z rjavimi oljnimi kapljicami na dnu. Opazno je, da smo dobili zelo malo produkta (iz 50 g lubja le 35,7 mg); izplen je bil 0,07%, kar nam že nakazuje, da aceton ni ustrezno topilo.

Poskus 2

Pri tem poskusu z etilacetatom smo glede na patentni postopek spremenili pogoje izolacije, in sicer smo temperaturo znižali na 70°C, čas pa podaljšali na 2 uri. Pri ekstrakciji je prišlo do težave, nastala je emulzija, ki smo jo potem razbijali s segrevanjem s sušilnikom za lase. Postopek je trajal kar kakšni 2 uri. Dobili smo zadovoljivo količino produkta (izplen 0,26%), vendar zaradi neustrezne konsistence in barve produkta (bil je lepljiv in rjav, mora

pa biti bele barve) nadaljnjih meritev antioksidativne aktivnosti in vsebnosti polifenolov nismo izvedli. K neustrezni konsistenci produkta je najverjetneje prispeval nastanek emulzije med ekstrakcijo, kakor tudi neustrezno sušenje organske faze pred obarjanjem. Prav tako je mogoče, da je bila kriva znižana temperatura pri maceraciji, saj se tako najverjetneje nismo znebili vseh hlapnih spojin v skorji, ki so sestavine eteričnega olja.

Poskus 3

S tem poskusom smo se že približali patentnemu postopku, saj smo zmleto lubje namakali pri 100°C, podaljšali smo le čas namakanja, saj smo namesto 15 minut namakali eno uro. Spet smo imeli težave z nastankom emulzije, ki smo jo uspešno razbili s segrevanjem s sušilnikom za lase in z dodatkom soli (natrijevega sulfata). Nastali so beli kosmiči, lepo se je oborilo. Izplen je znašal okoli 0,4%, kar je zadovoljivo, ugotovili pa smo izredno nizko vsebnost polifenolov (le 2,2%), prav tako je bil antioksidativni potencial nekoliko nižji. Predvidevamo, da je za slabši AOP in nizko vsebnost fenolov kriv podaljšan čas maceracije, saj je bilo ugotovljeno, da podaljšan čas ekstrakcije pri visokih temperaturah lahko vodi do inaktivacije polifenolov (10).

Poskus 4

Ker se suhi vodni ekstrakt slabo raztaplja v mešanici acetona in vode, smo dobili zanemarljivo malo produkta, tako da nadaljnjih meritev antioksidativne aktivnosti in vsebnosti polifenolov nismo izvedli.

Poskus 5

Ekstrakcija z etilacetatom je potekala brez težav, prav tako je šlo brez težav pri obarjanju in dobili smo zadovoljivo količino produkta (izplen glede na lubje je bil 0,24%). Ugotovljen je bil visok odstotek polifenolov, primerljiv s piknogenolom in abigenolom po patentnem postopku, je pa bila zato antioksidativna aktivnost nekoliko nižja (64% piknogenolove).

Poskus 6

Pri acetonskem izvlečku smo dobili zelo malo oborine, ker se suhi vodni ekstrakt zelo slabo raztaplja v acetonu. Iz 5 g suhega vodnega ekstrakta se je ekstrahiralo le 40 mg (izplen glede na lubje je bil 0,04%).

Poskus 7

Pri postopku ekstrakcije z etanolom smo dobili veliko produkta (izplen glede na lubje je bil 0,34%), zato smo preverili še kakovost produkta z merjenjem antioksidativne aktivnosti in vsebnosti polifenolov. Antioksidativni potencial znaša le 39% piknogenolovega, prav tako je nizka vsebnost polifenolov (24,8%). Etanol nam ekstrahira tudi nezaželene, bolj hidrofilne spojine, zato ni ustrezno topilo.

Poskus 8

Pripravljena mešanica se nam je zelo skepila, ni se dala mešati niti z magnetnim mešalom, niti se ni raztapljala v ultrazvoku, zato smo to metodo opustili.

Poskus 9

Tako brezvodni etilacetat kot metilacetat sta se izkazala za neustrezni topili za suhi vodni ekstrakt, saj nam je v obeh primerih nastalo zelo malo produkta, v postopku z metilacetatom pa je bil le-ta tudi lepljiv.

Poskus 10

Po prvotnih težavah, ko nam je nastala namesto oborine lepljiva zmes in ko smo potem ponovno sušili z rotavaporjem ter raztapljali v etanolu, smo dobili lepo oborino. Oborilo se je precej produkta (izplen glede na lubje je bil 0,44%). Antioksidativni potencial tukaj znaša 53% piknogenolovega, vsebnost polifenolov pa je 25%, kar je 52% glede na vsebnost polifenolov v piknogenolu. Zaradi nižjega AOP in vsebnosti polifenolov smo možnost ekstrakcije z 20% etanolom v acetonu opustili.

Poskus 11

Pri mešanici z etanolom je izpadlo zelo malo produkta, zato smo produkt in ostanek posušili do suhega, raztopili v brezvodnem etanolu in poizkusili znova oboriti s pentanom. Spet je nastalo zanemarljivo malo produkta. Nato smo izvedli še podoben postopek, se pravi ponovno sušenje, raztapljanje v brezvodnem etanolu in obarjanje, tokrat spet s heptanom, ki pa nam je prav tako dal zanemarljivo malo produkta. Na HPLC je bilo ugotovljeno, da ima produkt sicer željen profil, vendar ga je bilo zelo malo. Enak postopek smo preizkusili z metanolnim izvlečkom, kjer pa nam ni nastalo popolnoma nič.

Zaradi izjemno nizkega izkoristka nadaljnjih meritev AOP in vsebnosti polifenolov nismo izvajali.

Poskus 12

Iz tekočega vodnega ekstrakta, ki smo ga dobili iz podjetja Tanin Sevnica d.d., nismo dobili produkta, saj smo postopek prekinili že pri prvem poskusu ekstrakcije z etilacetatom, saj nam je nastala emulzija (**Slika 66**), ki jo je bilo nemogoče razbiti tudi s soljo in vročim zrakom.

Poskus 13

Iz suhega vodnega ekstrakta iz Tanina Sevnica d.d., proizvedenega januarja 2010 smo dobili malo produkta, in sicer 52 mg, izplen glede na lubje je bil le 0,05%, prav tako pa smo ugotovili, da ima produkt nizek antioksidativni potencial (le 29%). Zato meritve vsebnosti polifenolov nismo izvajali. Ker smo uporabljali enak postopek kot pri vzorcu številka 5, lahko primerjamo kakovost obeh suhih vodnih ekstraktov, dobljenih iz podjetja Tanin Sevnica d.d.. Pri vzorcu 5 (septembrski ekstrakt) smo dobili 240,7 mg produkta z antioksidativnim potencialom, ki je ustrezal 64% AOP piknogenola. Na podlagi teh primerjav smo ugotovili, da januarski suhi vodni ekstrakt nima ustrezne kvalitete za nadaljnje delo.

Poskus 14

Pri ekstrakciji po patentnem postopku nismo imeli nobenih problemov, razen nastanka rahle emulzije, ki smo jo zlahka razbili z dodatkom soli in s segrevanjem (**Slika 67**). Izpadlo nam je veliko produkta, izplen je bil 0,49%. Tudi antioksidativni potencial potrjuje, da smo dobili dober produkt, saj je le-ta enak kot pri piknogenolu.

Poskus 15

Pri postopku ekstrakcije iz svežega lubja smo imeli več težav kot običajno, saj nam je zaradi premočnega stresanja nastala malce bolj trdovratna emulzija, ki pa se jo je dalo razbiti z dodatkom soli in segrevanjem.

Nasprotno pa pri postopku iz starega lubja emulzije, ki nam je nastala, nismo mogli popolnoma razbiti, ni nam uspelo niti s segrevanjem, ob dodatku soli pa je prišlo še do obarjanja. Tako so bile zaradi otežene izolacije večje izgube. Tudi meritve AOP-ja kažejo

na slabšo kakovost produkta iz starega (jesenskega lubja), saj znaša vrednost AOP-ja pri jesenskem lubju le 38% vrednosti piknogenola. Nepričakovano smo dobili nizko vrednost AOP-ja tudi pri produktu iz svežega lubja, le-ta znaša 67% vrednosti piknogenola. Nekoliko so na to morda vplivale omenjene težave pri ekstrakciji, saj smo še pri prejšnjem poskusu iz istega lubja dobili dosti višji AOP. Pri primerjavi starega (jesenskega) in svežega (pomladanskega) lubja smo torej potrdili že znano tezo iz prejšnjih raziskav (21), da je izplen pri ekstrakciji iz svežega lubja večji kot pri ekstrakciji iz starega lubja, za kar so najverjetneje krive spremembe same sestave lubja ob staranju - najverjetneje je prišlo do polimerizacije nekaterih komponent.



Slika 66: Stabilna emulzija v organski fazi (zgoraj, najtemnejše barve), nekaj ločene vodne faze na sredini (oranžne barve) in spodaj v rumeni, najsvetlejši barvi vodno fazo s soljo. Ob nastanku takšne emulzije je bilo le-to nemogoče razbiti in smo postopke opustili.



Slika 67: Ločeni organska (zgoraj) in vodna faza (spodaj) z le nekaj oborine na sredini, ki je posledica dodatka soli za nastanek nasičene raztopine oz. za razbitje emulzije.

Skupno vsem poskusom, ko smo kot izhodni material vzeli lubje jelke ali bora, je, da nam je vedno nastala emulzija, ki smo jo v nekaj primerih zlahka razbili že z dodatkom soli, v nekaterih primerih, ko smo uporabili staro skorjo, pa je bila emulzija bolj trdovratna in faz nismo mogli popolnoma ločiti. Prav tako nam je nastala emulzija, ki jo je bilo nemogoče razbiti, pri poskusu s tekočim vodnim ekstraktom, ki smo ga dobili iz podjetja Tanin Sevnica d.d.

Sklepamo lahko, da je pri staranju lubja prišlo do nekaterih sprememb v sestavi; najverjetneje do polimerizacije nekaterih sestavin lubja, ki so se kasneje oborile. Na nastanek emulzije pa najverjetneje vplivajo ioni smolnih kislin (delujejo kot anionski detergenti).

Dalje smo ugotovili najvišji izplen (0,49%) pri patentnem postopku (poskus št. 14), sledili so poskusi št. 10 (uporabljeno topilo 20% etanola v acetonu), 3 (patentni postopek s podaljšanim časom ekstrakcije), 7 (namesto etilacetata smo kot topilo suhega vodnega ekstrakta uporabili etanol), 15 (patentni postopek), 2 (patentni postopek z znižano temperaturo in podaljšanim časom ekstrakcije) in poskus številka 5, kjer smo ekstrakcijo izvedli po patentnem postopku iz suhega vodnega ekstrakta.

Najvišji AOP je bil prav tako izmerjen pri patentnem postopku številka 14, sledijo mu poskus številka 3 (patentni postopek s podaljšanim časom ekstrakcije), patentni poskus s številko 15, patentni postopek iz suhega lubja s številko 5 in poskus z uporabo topila 20% etanol v acetonu pod številko 10.

Pričakovali bi, da bodo rezultati merjenja AOP-ja odvisni od vsebnosti polifenolov, vendar se pri nekaterih poskusih to ni izkazalo za resnično. Tako pride do anomalije na primer pri poskusu številka 3, ki je tako po izkoristku kot vrednosti AOP pri vrhu poskusov, vsebnost polifenolov pa ima zelo nizko (le 2,2%) ter pri postopku številka 5 (patentni postopek iz suhega lubja), kjer pa imamo visoko vsebnost polifenolov, primerljivo z vsebnostjo v piknogenolu in abigenolu po patentnem postopku, imamo pa nižji AOP. Sicer pa tudi po vsebnosti polifenolov prednjači patentni postopek za abigenol, ki ima 52,2% vsebnost polifenolov, piknogenol ima 49,9% vsebnost polifenolov, sledi pa patentni postopek iz suhega lubja, ki ima 43,7% oziroma 42,8% vsebnost polifenolov. Pri poskusu številka 3 bi lahko prišlo do tako nizke vsebnosti polifenolov zaradi podaljšanega kontaktnega časa, ki ima lahko za posledico deaktivacijo polifenolov. Pri patentnem postopku iz suhega vodnega ekstrakta pa si lahko visoko vsebnost polifenolov in nekoliko nižji AOP razlagamo s tem, da so se oborili polifenoli, ki nimajo antioksidativne aktivnosti.

Ugotovili smo torej, da je za izolacijo polifenolov iz lubja jelke najugodnejši patentni postopek. Vsa nadomestna topila za suhi vodni ekstrakt, ki smo jih preizkusili (acetone, 20% etanola v acetone, brezvodni etanol, etanol ter metanol v etilacetatu, acetone s 5% vode, nasičena raztopina etilacetata, brezvodni etilacetat ter metilacetat), so se izkazala za neuspešna ali zaradi nizkih izkoristkov ali zaradi slabih rezultatov nadaljnjih meritev AOP in vsebnosti polifenolov. Prav tako se je kot boljša možnost ekstrakcije izkazala direktna ekstrakcija vodnega ekstrakta lubja, kot pa raztapljanje suhega vodnega ekstrakta v vodi in nadaljnja ekstrakcija z etilacetatom. Ugotovili smo tudi, da pri 100°C podaljšanje ekstrakcijskega časa vodi v deaktivacijo polifenolov, saj je bila vsebnost polifenolov v tem ekstraktu izjemno nizka. Prav tako se za neugodno izkaže znižana temperatura in podaljšan čas ekstrakcije (poskus številka 2 ter poskus s skorjo bora), saj smo imeli veliko težav že pri sami ekstrakciji, nastala produkta pa sta bila tudi neustrezne konsistence.

Ugotovili smo še izjemen AOP pri našem postopku pridobivanja piknogenola, saj ima naš izvleček v primerjavi s tovarniškim kar 1,6-krat višji AOP. To si razlagamo s tem, da je pentan za obarjanje optimalnejši od kloroforma, uporabljenega pri patentnem postopku.

Že majhne spremembe v postopku, kot je na primer sprememba pogojev ekstrakcije, različen izhodni material (sveže in staro lubje, suhi vodni ekstrakt) povzročijo veliko razliko v kvaliteti in sestavi produkta. To nam kaže na slabo robustnost postopka izolacije. Zato bi bilo za nadaljnjo optimizacijo smiselno uporabiti nove postopke izolacije, ki bi izboljšali robustnost sistema.

VII. SKLEPI

1. Optimizacijo ekstrakcije in izolacije antioksidativnih polifenolov iz lubja jelke smo pripravili na veliko različnih načinov. Za osnovo nam je služil patentni postopek za abigenol. Pri postopku optimizacije smo spreminjali pogoje ekstrakcije, uporabljali smo različna topila in različne izhodne materiale za ekstrakcijo. Pknogenol in abigenol, izdelan po patentnem postopku, sta nam služila kot standarda, s katerima smo primerjali izvlečke, dobljene pri naših poskusih.
2. Vsa nadomestna topila, ki smo jih uporabili namesto etilacetata, uporabljenega v patentnem postopku, so se izkazala za neustrezna, saj produkti niso imeli ustreznega AOP-ja in/ali ustrezne vsebnosti polifenolov, ali pa je bil izplen prenizek.
3. Za najbolj ustrezno se je izkazala ekstrakcija tekoče/tekoče, uporabljena v patentnem postopku. Pri direktni ekstrakciji iz suhega vodnega ekstrakta (trdno/tekoče) se nam suhi vodni ekstrakt bodisi ni raztapljal v uporabljenih topilih bodisi produkti niso bili ustrezni. Prav tako se za boljšo izkaže direktna ekstrakcija tekočega vodnega ekstrakta lubja, kot pa raztapljanje suhega vodnega ekstrakta v vodi in nadaljnja ekstrakcija z etilacetatom. Tudi tekoči vodni ekstrakt, ki smo ga dobili iz podjetja Tanin Sevnica, d.d. se je izkazal kot neustrezen.
4. Za najbolj optimalne pogoje ekstrakcije so se prav tako izkazali tisti, ki so navedeni v patentnem postopku. Podaljšanje časa ekstrakcije pri 100°C tako vodi v deaktivacijo polifenolov, temperatura znižana na 70°C pa prav tako ni ustrezna, saj smo imeli težave že pri sami ekstrakciji, nastali produkti pa so imeli neustrezno konsistenco.
5. Potrdili smo že znano ugotovitev, da je ekstrakcijo bolje izvajati iz svežega kot pa iz starega lubja.
6. Na podlagi opravljenih poskusov smo prišli do zaključka, da je patentni postopek pridobivanja antioksidativnih polifenolov iz lubja navadne jelke v primerjavi z našimi poskusi najustrežnejši. Bi pa bilo zaradi izjemno slabe robustnosti sistema (že majhne spremembe v postopku so nam povzročile velike razlike v konsistenci in kvaliteti

produkta) v nadaljnje smiselno optimizirati postopek tako, da bi izboljšali robustnost sistema.

VIII. LITERATURA

1. Ribarič S, et. al.: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije – 8. izdaja, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 1996: 25-42.
2. Roberfroid M, Buc Calderon P: Free radicals and oxidation phenomena in biological systems, Marcel Dekker, New York, 1995: 13-29, 145-184.
3. Finaud J, Lac G, Filaire E: Oxidative stress – Relationship with Exercise and Training. *Sports Medicine* 2006; 36: 327-358.
4. Manček B, Pečar S: Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih. *Farm Vestn* 2001; 52: 133-144.
5. Cadenas E, Packer L: Handbook of antioxidants – 2. izdaja, Taylor&Francis, New York, 2002.
6. <http://en.wikipedia.org/wiki/> Datum dostopa: 15. 10. 2010.
7. <http://en.citizendium.org/wiki/Carotenoid> Datum dostopa: 15. 10. 2010.
8. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 79: 727-747.
9. Grotewold E: The science of flavonoids, Springer, New York, 2008.
10. Makkar H.P.S., Siddhuraju P, Becker K: Methods in Molecular Biology - Plant Secondary Metabolites, Humana Press, Totowa, 2007: 67-81.

11. Behrens A, Maie N, Knicker H, Koegel-Knabner I: MALDI-TOF mass spectrometry and PSD fragmentation as means for the analysis of condensed tannins in plant leaves and needles, *Phytochemistry* 2003; 62: 1159-1170.
12. Karonen M, Loponen J, Ossipov V, Pihlaja K: Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 2004; 522: 105-112.
13. Ku C.S., Jang J.P., Mun S.P.: Exploitation of polyphenol-rich pine barks for potent antioxidant activity, *J Wood Sci* 2007; 53: 524-528.
14. Jerez M, Tourino S, Sineiro J, Torres J.L., Nunez M.J.: Procyanidins from pine bark: Relationships between structure, composition and antiradical activity, *Food Chemistry* 2007; 104: 518-527.
15. Tourino S, Selga A, Jimenez A, Julia L, Lozano C, Lizarraga D, Cascante M, Torres J.L.: 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* 2005; 53: 4728-4735.
16. Packer J, Rimbach G, Virgili F: Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, *Pycnogenol. Free Radical Biology & Medicine* 1999; 27: 704-724.
17. Masquelier J: Plant extract with a proanthocyanidins content as therapeutic agent having radical scavenger effect and use thereof. United states patent, Patent number 4,698,360, Date of patent Oct. 6, 1987.
18. Duden leksikon: Rastline, Učila international, Tržič, 2002: 118.

19. Schoenfelder P, Schoenfelder I: Zdravilne rastline-vodnik, Založba Narava, Kranj, 2006: 292.
20. Yang S.A, Jeon S.K., Lee E.J., Im N.K., Jhee K.H., Lee S.P., Lee I.S.: Radical scavenging activity of the essential oil of silver fir (*Abies alba*). J Clin Biochem Nutr 2009; 44(3): 253-259.
21. Mravlje V: Analiza antioksidativnih spojin v skorji navadne smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) in skorji navadne jelke (*Abies alba* Mill.), Diplomsko delo, Fakulteta za Farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2008.
22. Štrukelj B, Kreft S, Umek A, Janeš D: Antioksidativni izvleček iz skorje jelke in smreke. Patent SI 22882 (A), 30. 4. 2010.
23. Molyneux P: The use of stable free radical diphenylpicryl-hydrazine (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J Sci Technol 2004; 26(2): 211-219.
24. <http://waterhouse.ucdavis.edu/phenol/foolinmicro> Datum dostopa: 23. 10. 2010.
25. Prior R.L., Wu X, Schaich K: Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem 2005; 53: 4290-4302.