

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO  
Univerzitetni program farmacije

ERIKA TURK

RAZVOJ SPEKTROFOTOMETRIČNE IZVEDBE KARL FISCHER-JEVE  
METODE ZA UGOTAVLJANJE VSEBNOSTI VODE IN OPTIMIZACIJA  
TOPIL ZA EKSTRAKCIJO POLIFENOLOV IZ LUBJA NAVADNE  
JELKE (*Abies alba* MILL.)

DEVELOPMENT OF SPECTROPHOTOMETRIC IMPLEMENTATION  
OF KARL FISCHER METHOD FOR DETERMINATION OF WATER  
CONTENT AND OPTIMIZATION OF SOLVENTS FOR EXTRACTION  
OF POLYPHENOLS FROM EUROPEAN SILVER FIR (*Abies alba* MILL.)

BARK

Ljubljana, september 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo, pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm., za strokovno pomoč in vodenje pri izdelavi diplomskega dela.

Veliko zahvalo dolgujem tudi delovni mentorici Evi Tavčar, mag. farm., in sicer za vso prejeto pomoč v laboratoriju ter za spodbudo pri pisanju diplomskega dela.

Hvala moji družini, ker ste mi stali ob strani, me podpirali in spodbujali tekom študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo ob mentorstvu prof. dr. Sama Krefta, mag. farm., izdelala samostojno.

Erika Turk

Predsednik komisije: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

Ljubljana, september 2012

# Vsebina

1.	Uvod .....	1
1.1	Karl Fischer-jeva metoda.....	1
1.2	DPPH metoda .....	7
1.3	Topila.....	10
1.3.1	Glicerol .....	10
1.3.2	Glicerol triacetat .....	10
1.3.3	Capmul MCM®.....	11
1.3.4	PEG 400.....	11
1.3.5	Oljčno olje .....	12
1.4	Bela jelka .....	13
1.5	Pycnogenol®.....	14
1.6	Izvleček lubja bele jelke .....	15
2.	Namen dela .....	16
3.	Materiali in metode.....	17
3.1	Rastlinski material .....	17
3.2	Kemikalije.....	17
3.3	Aparature in oprema .....	18
3.4	Metode .....	19
3.4.1	Analizna HPLC .....	19
3.4.2	DPPH metoda .....	20
3.4.3	Karl Fischer-jeva metoda z uporabo Hydralan® kompleta.....	21
4.	Eksperimentalno delo .....	25
4.1	Priprava ekstrakta .....	25
4.2	Volumen ekstrakta .....	26

---

4.3	DPPH metoda .....	26
4.4	Določanje vode s Karl Fischer-jevo metodo.....	27
4.5	Redčenje PEG ekstrakta.....	28
5.	Rezultati in razprava.....	29
5.1	Volumen ekstrakta .....	29
5.2	HPLC analiza.....	30
5.3	DPPH metoda .....	41
5.4	Ugotavljanje vode v ekstraktih s Karl Fischer-jevo metodo.....	42
5.5	Validacija Karl Fischer-jeve metode .....	45
6.	Sklep .....	51
7.	Literatura .....	52

Slika 1:	Prikaz tvorbe vode pri reakciji aldehida z metanolom.....	4
Slika 2:	Prikaz odvisnosti toka od volumna joda. ....	5
Slika 3:	Shema aparature za biamperometrično titracijo.....	5
Slika 4:	Shema aparature za volumetrično titracijo.....	6
Slika 5:	Shema aparature za koulometrično titracijo.....	7
Slika 6:	Difenilpikrilhidrazil v obliki radikala. ....	8
Slika 7:	Difenilpikrilhidrazin.....	8
Slika 8:	Mehanizem reakcije DPPH z molekulo, ki ima dva donorja vodika. ....	8
Slika 9:	Molekula glicerola.....	10
Slika 10:	Molekula glicerol triacetata.....	11
Slika 11:	Molekula PEG.....	11
Slika 12:	Značilnosti bele jelke. ....	13
Slika 13:	Graf absorpcije DPPH glede na valovno dolžino svetlobe. ....	20

---

Slika 14: Ekstrakcija vodnega izvlečka etilacetatnim topilom.....	25
Slika 15: Etilacetatni izvleček z vsebnostjo vode (necentrifugirani etilacetatni izvleček)..	25
Slika 16: Centrifugirani etilacetatni izvleček. ....	26
Slika 17: Čisti etilacetatni izvleček. ....	26
Slika 18: Prikaz izvedbe modificirane Karl Fischer-jeve metode. ....	27
Slika 19: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za standardni PEG ekstrakt....	30
Slika 20: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za PEG ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo. ....	31
Slika 21: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za 85 % glicerolni ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo.....	32
Slika 22: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za glicerol triacetatni ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo. ....	32
Slika 23: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za dv mešani gliceridni ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo. ....	33
Slika 24: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za Capmul MCM® ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo.....	33
Slika 25: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za topila pri petem nasičenju, preračunana na isti volumen ekstrakta.....	34
Slika 26: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za PEG 400 ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo.....	35
Slika 27: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za 100 % glicerolni ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo.....	35
Slika 28: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za glicerol triacetatni ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo. ....	36
Slika 29: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za Capmul MCM® ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo.....	36
Slika 30: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za topila pri petem nasičenju, preračunana na isti volumen ekstrakta.....	37

Slika 31: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za mešanice ekstraktov s čistimi topili in ekstraktov z ekstrakti. ....	39
Slika 32: Redčenje PEG ekstrakta z dv mešanimi gliceridi. ....	39
Slika 33: Redčenje PEG ekstrakta z glicerol triacetatom. ....	40
Slika 34: Redčenje PEG ekstrakta z glicerolom. ....	40
Slika 35: AOP vsakega topila in nasičenja za prvo ekstrakcijo, kjer smo fazi ločili z lij ločnikom. ....	41
Slika 36: Vsebnost vode (%) v ekstraktih pri prvi ekstrakciji, kjer smo fazi ločili z lij ločnikom. ....	43
Slika 37: Vsebnost vode (%) v ekstraktih pri drugi ekstrakciji, kjer smo fazi ločili s pomočjo centrifugiranja.....	43
Slika 38: Vsebnost vode (%) pri standardnem PEG ekstraktu, čistem glicerolu in metanolu. ....	45
Slika 39: Vsebnost vode (%) v standardnem PEG ekstraktu in z dodatki vode, PEG 400 topilu in z dodatki vode, 96 % EtOH in standardu. ....	47
Slika 40: Vsebnost vode (%) pri PEG 400, 96 % EtOH in standardu določeno z referenčno Hydralal® metodo. ....	48
Slika 41: Vsebnost vode (%) v standardnem PEG ekstraktu in PEG 400 z dodatki vode. .	50
Graf 1: Določanje vlage v standardnem PEG ekstraktu pri 500 nm dne 5.7.2011.....	23
Graf 2: Odvisnost absorbance od titracijskega volumna. ....	24
Graf 3: Prikaz linearnosti spektrofotometričnih določitev vsebnosti vode glede na točne vrednosti. ....	48
Graf 4: Prikaz linearnosti spektrofotometričnih določitev vsebnosti vode glede na točne vrednosti. ....	50
Preglednica I: Dodatek vzorca glede na vsebnost vlage.....	24

---

Preglednica II: Volumen ekstraktov pri prvem poizkusu, kjer smo fazi ločili z lij ločnikom.	29
Preglednica III: Volumen ekstraktov po drugem poizkusu, kjer smo fazi ločili s pomočjo centrifugiranja.....	30
Preglednica IV: Lastnosti pri mešanju PEG ekstrakta z dv mešanimi gliceridi.....	39
Preglednica V: Lastnosti pri mešanju PEG ekstrakta z glicerol triacetatom.....	40
Preglednica VI: Lastnosti pri mešanju PEG ekstrakta z glicerolom. ....	40
Preglednica VII: Lastnosti pri mešanju PEG ekstrakta z oljčnim oljem. ....	41
Preglednica VIII: DPPH rezultati druge ekstrakcije, kjer smo fazi ločili s pomočjo centrifugiranja.....	42
Preglednica IX: Vsebnost vode v standardnem PEG ekstraktu.....	44
Preglednica X: Določitev vode v standardnem (stan.) PEG ekstraktu in z dodatki vode, PEG 400 topilu in z dodatki vode, 96 % EtOH in standardu. ....	46
Preglednica XI: Določitev vode PEG 400, 96 % EtOH in standardu z referenčno Hydralal® metodo .....	47
Preglednica XII: Primerjava spektrofotometričnih rezultatov s točnimi vrednosti vode v vzorcu. ....	48
Preglednica XIII: Določitev vode v standardnem PEG ekstraktu in PEG 400 z dodatki vode. ....	49
Preglednica XIV: Izmerjene in dejanske vsebnosti vode v vzorcih. ....	50

## Povzetek

Radikali so stalno prisotni v organizmu. Nastajajo zaradi eksogenih vzrokov, kot so UV žarčenje, onesnaženost zraka, pesticidi v hrani, endogeno pa zaradi oksidativnih reakcij v mitohondrijih in intenzivne fagocitoze. Reagirajo s številnimi biološkimi molekulami in povzročajo spremembe lipidov, proteinov in DNA. Proti tem spremembam se organizem borja z encimskimi in neencimskimi detoksifikacijskimi sistemi, katerim pa učinkovitost z leti upada. Rastline so bile prve soočene s kisikom na našem planetu, zato so najboljši vir antioksidantov, predvsem fenolnih spojin. Polifenoli imajo poleg antioksidativnega učinka tudi protivnetni in antikancerogeni učinek. Rastlinski antioksidativni pripravki so danes zelo iskana skupina prehranskih dopolnil, saj se oksidativni stres vpleta v patologijo raka, arterioskleroze, malarije, revmatoidnega artritisa in nevrodegenerativnih bolezni. Pknogenol® je izvleček lubja obmorskega bora, ki se vgraje v mnoga prehranska dopolnila in kozmetične izdelke. Kot alternativni vir so na Fakulteti za farmacijo razvili izvleček lubja jelke.

Zaradi vgrajevanja izvlečka jelkinega lubja v farmacevtske oblike in kozmetične izdelke, smo preizkušali različna topila za izvleček jelkinega lubja kot so PEG 400, glicerol, glicerol triacetat, Capmul MCM® ter dolgoverižne (dv) mešane gliceride. Pridobljenim vzorcem smo izmerili volumen, ovrednotili s HPLC, izmerili antioksidativni potencial z DPPH metodo in izmerili vsebnost vode s Karl Fischer-jevo metodo. Kvalitativno so si ekstrakti z uporabo različnih topil medsebojno podobni, vendar ne tudi kvantitativno. Za pripravo ekstrakta je najprimernejši PEG 400. Glicerol se ni izkazal za uporabnega, saj je tekom ekstrakcije vezal vodo. Visoka lipofilnost glicerol triacetata in Capmula MCM® otežuje HPLC in DPPH analizo. Antioksidativni potencial je bil pri obeh topilih nižji v primerjavi s PEG 400 in glicerolom. Za ugotavljanje vsebnosti vode se najpogosteje uporablja Karl Fischer-jeva metoda, za katero potrebujemo specializirano in drago opremo. S komercialnimi volumetričnimi kompleti ne moremo določiti vsebnost v ekstraktih lubja jelke, ker so temno rjavo obarvani. Razvili smo modificirano volumetrično Karl Fischer-jevo titracijo, kjer smo končno točko ugotovili s spektrofotometrom, ker je na spremembe barve bolj občutljiv kot prosto oko. Absorbanco smo merili pri 520 nm tekom titracije. Končno točko smo določili s presečiščem titračijskih premic v prikazu odvisnosti med

absorbanco in titracijskim volumnom. Metoda je ponovljiva ( $RSD = 4,3\%$ ), točna in linearna ( $R^2 = 0,997$ ).

## Abstract

Radicals are constantly present in organisms. They are produced due to exogenous reasons, such as UV radiation, air pollution, pesticides found in food, as well as endogenously due to oxidative reactions in mitochondria and intensive phagocytosis. They react with numerous biological molecules and cause changes in lipids, proteins and DNA. The organism fights against these changes with the help of enzymatic and non-enzymatic detoxification systems, whose efficiency is slowly reduced with age. Plants were the first ones confronted with the oxygen on our planet and this is why they are the best source of antioxidants, especially phenolic compounds. Polyphenols, besides having an antioxidative effect, also have anti-inflammatory and anticancerogenous effects. Antioxidative plant concoctions are nowadays a highly wanted group of food supplements for the oxidative stress is connected to cancer pathology, arteriosclerosis, malaria, rheumatoid arthritis and neurodegenerative disorders. Pycnogenol® is an extract of the *Maritime pine* bark that has become a part of numerous food supplements and cosmetic products. At the Faculty of Pharmacy, an extract of fir tree has been developed as an alternative source.

Several solvents such as PEG 400, glycerol, glycerol triacetate, Capmul MCM® and long-chain mixed glycerides have been tested due to adding fir tree bark extract into pharmaceutical and cosmetic products. The volume of the obtained samples was measured. What is more, they were analysed with the help of HPLC and their antioxidative potential was measured with DPPH method. The water content was measured using the Karl Fischer method. In terms of quality, the extracts with different solvents are similar; however, they differ in terms of quantity. PEG 400 is the most suitable solvent for extract preparation. Glycerol has not proved itself useful for it bound with water during the extraction. High lypophilicity of glycerol triacetate and Capmul MCM® makes HPLC and DPPH analyses difficult. Antioxidative potential was lower with both solvents compared to PEG 400 and glycerol. Water content is most often determined by Karl Fischer method for which specialized and expensive equipment is needed. Commercial, volumetric sets cannot be used to determine water content in fir bark extracts because they are of dark brown colour. Therefore, modified voulometric Karl Fischer titration has been evolved where the endpoint can be detected with the help of a spectrophotometer because it is more sensitive to changes in colour than the naked eye. Absorbance was measured at 520 nm. The

endpoint is determined at the intersection of titration lines in a correlation graph between absorbance and titration volume. The method is reproducible ( $RSD = 4,3\%$ ), accurate and linear ( $R^2 = 0,997$ ).

# Seznam okrajšav

DNA – deoksiribonukleinska kislina

LD<sub>50</sub> – odmerek spojine, ki ubije polovico (50 %) testiranih živali

PEG – polietilenglikol

HDL – lipoprotein z visoko gostoto

dv – dolgoverižni

DPPH - 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

A<sub>0</sub> - začetna absorbanca (absorbanca slepega vzorec)

Ac - absorbanca po dodani koncentraciji vzorca

ΔA - sprememba absorbance

ε – molarni ekstinkcijski koeficient

Δc – sprememba koncentracije

L – dolžina poti svetlobe skozi vzorec (ponavadi kivete)

n – množina snovi

c – koncentracija

V – volumen snovi

EC<sub>50</sub> = IC<sub>50</sub> – koncentracija, ki je potrebna za polovico maksimalnega učinka

TFA - trifluoroacetna kislina

MeCN – acetonitril

I<sub>2</sub> - jod

SO<sub>2</sub> – žveplov dioksid

H<sub>2</sub>O - voda

HI – vodikov jodid

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – žveplova (VI) kislina

C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N – piridin

CH<sub>3</sub>OH - metanol

MO – kovinski oksid

MI<sub>2</sub> – jodid kovine

FeCl<sub>3</sub> – železov (III) oksid

CuCl<sub>2</sub> – bakrov (II) klorid

CuSO<sub>4</sub> – bakrov (II) sulfat

SnCl<sub>2</sub> – kositrov (II) klorid

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – natrijev tiosulfat

f - titer (mg vode potrebeni za interakcijo z 1 mL reagenta)

m - masa

AOP – antioksidativni potencial

EtOH – etanol

RSD – relativna standardna deviacija

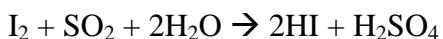
SD – standardna deviacija

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

# 1. Uvod

## 1.1 Karl Fischer-jeva metoda

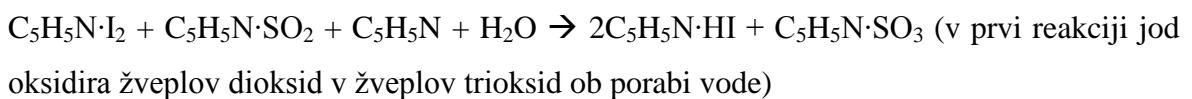
V farmacevtski industriji je potrebno poznati vsebnost vlage v farmacevtskem pripravku za pravilno napoved stabilnosti, učinkovitosti, kakovosti in časa uporabnosti. Pri klasičnih metodah, kot so sušenje v pečici, vakuumsko sušenje, sušenje z zamrzovanjem, infrardeče ali mikrovalovno sušenje, ne razlikujemo med vodo in drugimi hlapnimi snovmi. Rezultat teh metod ni ugotavljanje vsebnosti vode, ampak izgube mase. Takšne meritve so tudi dolgotrajne, zato se za določanje vlage najpogosteje uporablja primernejša metoda, Karl Fischer-jeva metoda (1, 2, 3, 4). Voda spremeni fizikalne lastnosti vzorca, zato lahko njen vsebnost ugotavljamo tudi z merjenjem gostote, refraktometrično in polarimetrično (5). Leta 1935 je Karl Fischer objavil postopek za titracijo vode v brezvodnih topilih. Kemijska reakcija titracije temelji na oksidaciji žveplovega dioksida z jodom ob porabi vode (5, 6).



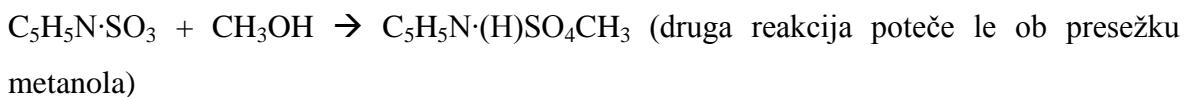
### REAGENTI

#### Baza

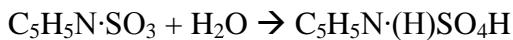
Baza nevtralizira nastalo kislino v Karl Fischer-jevi reakciji in s tem pomakne ravnotežje reakcije v desno. Prvotno uporabljena baza je bila piridin, ki sta jo kasneje zamenjala dietanolamin in imidazol (7, 8). Praktično so ugotovili, da za redukcijo enega mola joda nista potrebna dva mola vode, temveč 1:1 ob uporabi piridina kot baze, saj zaradi presežka piridina nastanejo piridinski adukti:



in dalje:



Namesto metanola se lahko v reakcijo vpleta tudi voda, kar lahko preprečimo z velikim presežkom metanola (7, 8).



Metanol se pogosto v reagentih zamenjuje z etanolom, saj je manj strupen in reagenti tvorijo bolj stabilno končno točko titracije in imajo hitrejšo kinetiko (9).

### Topilo

Topilo lahko izberemo glede na lastnosti analiziranega vzorca. Če imamo v topilu več kot 25 % metanola, je stehiometrično razmerje 1:1. Lahko uporabljamo tudi topila, ki ne vsebujejo metanola, vendar je potrebno določiti titer Karl Fischer-jevega titranta. Novejša topila imajo veliko puferno kapaciteto in veliko sposobnost raztopljanja. Sestavljena so iz žveplovega dioksida, baze in metanola ali etanola.

Prednosti novejših topil so:

- hitrejša titracija zaradi boljše kinetike (prednost pri vzorcih z veliko količino vode),
- boljša ponovljivost, saj ima okolje manjši vpliv, pH in koncentracija žveplovega dioksida ostajata konstantna.

Pri titraciji aldehidov in ketonov je potrebna previdnost, saj tvorijo stranske reakcije z metanolom in tvorijo vodo, kar lažno poviša rezultate. Ta problem lahko rešimo z dodatkom etanola, oktanola, etilenglikola, piridina, acetonitrila ali tetrahidrofurana (5, 6). Za določitev adsorbirane vode brez kristalne vode uporabimo topilo dioksan, v katerem so kristalohidrati netopni (7, 8).

### Titrant

Titrant je sestavljen iz joda, ki je raztopljen v metanolu ali etanolu. Hitrost dodajanja titranta je pomembna, saj mora titrant reagirati z vodo (6). Na žalost ima titrant omejen rok uporabe. Pripravljeni reagenti imajo večji delež žveplovega dioksida (2-krat) in piridina (3-4-krat), kot ga predpisuje stehiometrija. Piridin deluje kot stabilizator, ki prepreči izgubo oksidacijske sposobnosti joda, žveplov dioksid pa deluje kot reducent, ki ga jod oksidira. S prebitkom obeh spojin preprečimo prekinitev reakcije zaradi pomanjkanja reagentov in zagotovimo potek reakcije dokler je prisotna voda. Vrednost titra, ki ga določamo glede na priporočila proizvajalca, je 2-5 mg vode na mL reagenta. Določamo ga dnevno s standardnim vzorcem, ki ima znano množino kristalno vezane vode, običajno je to natrijev tartrat dihidrat. Današnji komercialni reagenti so bolj stabilni in potrebujejo le občasno

---

določitev titra. Zaradi oksidacijske sposobnosti joda je sveže pripravljena raztopina še nekaj ur nestabilna, saj oksidira nečistote (7, 8, 10).

## VZORCI

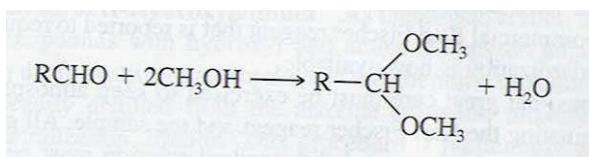
Analiziramo lahko trdne, tekoče in plinaste snovi, neodvisno od ostalih hlapnih snovi. A na žalost niso vsi vzorci primerni za analizo s Karl Fischer-jevo metodo. Pomembno je, da so vzorci topni v topilu in da kemijsko ne interagirajo s Karl Fischer-jevimi reagenti (5, 7). Direktno titracijo uporabljamo, kadar so vzorci topni v metanolu, piridinu ali dioksanu. Takšni vzorci so organske kisline, alkoholi, estri, etri, anhidridi in halidi. Hidratizirane organske soli in hidrati anorganskih soli večinoma niso topni v metanolu. Če jih dobro dispergiramo, jim lahko vlogo določamo z neposredno titracijo. Pri slabo topnih vzorcih izvedemo povratno titracijo. V titracijsko posodico s topilom in vzorcem dodamo presežek titranta, ki ga nato retitriramo s standardno raztopino vode v metanolu (8, 10). Druga možnost je priprava vzorcev s pečico, ki vzorec segreva in vodo s suhim nosilnim plinom prenese v titracijsko posodo. Ker v titracijsko posodo prehaja le voda, vzorec nima stika z reagenti, zato se s takim postopkom preprečijo stranske reakcije. Na enak način lahko ugotavljam vlogo v plinih (11).

## VPLIV pH

Titracija lahko poteka le v določenem razponu pH, med 5 in 7. V kislem pH počasneje in težje dosežemo končno točko, pri visokem pH pa stranske reakcije povzročajo spremembe v stehiometričnem razmerju. Za napake, ki se pojavljajo med titracijo je lahko kriva sprememba pH topila. pH lahko merimo s kombinirano pH elektrodo in pH metrom. Elektrodo najprej kalibriramo z vodno raztopino pufra in nato pomerimo pH topilu za titracijo. pH elektrode ne smemo vstaviti v celico za titracijo neposredno, saj lahko prispeva večji delež vlage (5, 6).

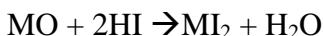
## INTERAKCIJE

Karbonilne spojine z metanolom tvorijo acetale ob odcepu molekule vode (Slika 1).



Slika 1: Prikaz tvorbe vode pri reakciji aldehida z metanolom.

Kovinski oksidi reagirajo z vodikovim jodidom, pri čemer se tvorita voda in jodid kovine.



Z vodikovim jodidom reagirajo tudi hidroksidi, karbonati in amonijak. Moteče spojine so tudi kromati,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , sulfiti, askorbat, kinoni in merkaptani, ker se obnašajo kot oksidanti ali reducenti (8, 10, 12).

## KONČNA TOČKA TITRACIJE

Končna točka titracije je pri prebitku joda oziroma njegovega piridinskega adukta, ki se pojavi, ko voda ni več prisotna v Karl Fischer-jevi celici. Presežek joda lahko opazujemo vizualno, fotometrično ali potenciometrično. Najpogosteje je v uporabi potenciometrično ugotavljanje končne točke (6). Vizualno lahko končno točko zaznamo s temno rjavim obarvanjem. Odstopanje pri vidni detekciji je  $\pm 0,2 \text{ mL}$  (3, 8, 10, 13).

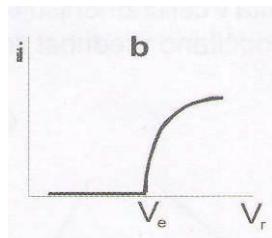
## PREDNOSTI IN SLABOSTI ANALIZE

Karl Fischer-jeva titracija je selektivna za vodo skoraj v neomejenem merilnem območju, od 1 ppm do 100 %. Rezultati so točni in natančni, če le preprečimo dostop atmosferske vlage. Za analizo potrebujemo majhen vzorec, brez posebne predpriprave. Čas analiziranja je v primerjavi s sušenjem kratek (7). Vso steklovino je potrebno pred uporabo posušiti. Reagente je potrebno zaščititi pred vplivom vlage. Prav tako je potrebno preprečiti stik atmosfere s titracijsko raztopino (10).

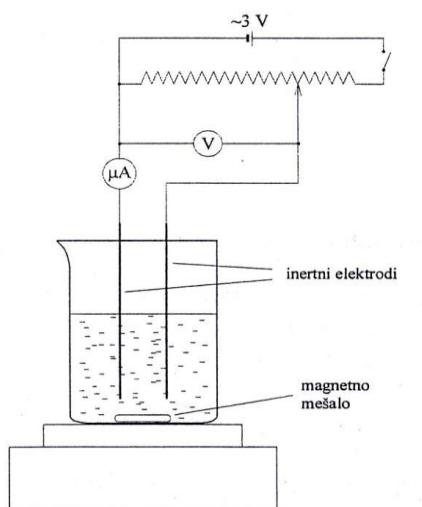
### *Potenciometrična titracija*

To so amperometrične titracije z dvema polariziranimi elektrodama (Slika 3). So najpogosteje uporabljene. Končno točko titracije se določi z merjenjem toka med dvema platinastima elektrodama, med katerima je majhna napetost (10-100 mV). Tok steče, ko je

v raztopini oksidacijsko-redukcijski par, kar se pojavi po ekvivalentni točki, ker je jod v prebitku in nastane par  $I_2/I$ . Titracijska krivulja je zato naslednje oblike (Slika 2) (5, 8, 13).



Slika 2: Prikaz odvisnosti toka od volumna joda. (8, 13)



Slika 3: Shema aparature za biamperometrično titracijo (8, 14)

Takšen način detekcije je zelo natančen, do 1  $\mu\text{g H}_2\text{O/mL}$  vzorca. Vsebnost vode se izračuna na podlagi volumna titranta, ki je potreben za električni tok med elektrodama.

### Volumetrična titracija

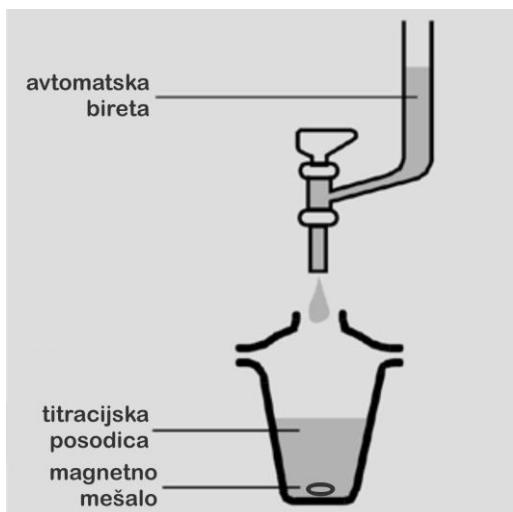
So titracije, pri katerih se meri količino porabljene raztopine joda v volumskih enotah. Aparatura je sestavljena iz avtomatske birete, titracijske posodice in magnetnega mešala (Slika 4). Kot topilo se uporablja metanol, ki ga titriramo s titrantom, ki je sestavljen iz alkohola, baze, žveplovega dioksida in joda, do končne točke (7). S tem se izniči vpliv vlage v topilu. Nato se doda znano količino vzorca in titrira z titrantom do končne točke.

Procent vode se izračuna po enačbi:

$$\text{Voda} = \frac{V(\text{titranta} - mL) \cdot f \left( \frac{mg}{mL} \right)}{m (\text{vzorca} - mg)}$$

f....titer (mg vode, potrebeni za interakcijo z 1 mL reagenta) (15)

Metoda nima tako nizke meje detekcije kot potenciometrična, saj zazna koncentracijo vode med 0,1 % do 100 %. Količino vzorca je potrebno prilagoditi vsebnosti vlage, da se titracija konča med porabo 1-10 mL titranta (6, 16).



Slika 4: Shema aparature za volumetrično titracijo.

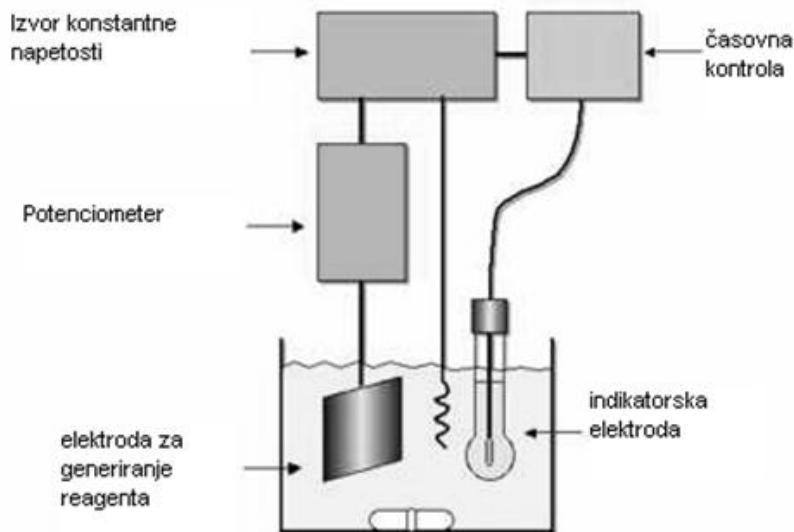
### Koulometrična titracija

Aparatura je sestavljena iz anode in katode, ki sta ločeni z ion-prepustno membrano in sistema za potenciometrično titracijo z neprekinjenim tokom (Slika 5). Anodno raztopino sestavlja alkohol (metanol ali dietilen glikol mono etil eter), baza (imidazol), žveplov dioksid in jodidni ion, ki ga z elektrolizo pretvorimo v jod. Nastali jod reagira z vodo. Končno točko določimo s padcem napetosti, ker v raztopini naraste koncentracija joda (5, 7). Vsebnost vode v vzorcu se določi z merjenjem električnega naboja, potrebnega za elektrolizo oziroma proizvodnjo joda.

Količino električnega naboja se določi po enačbi:

$C = \text{električni tok (A)} \cdot t(s)$  potreben za proizvodnjo joda med titracijo (15)

Koulometrična titracija se uporablja za določitev manjše količine vode, od  $10 \mu\text{g}$  do  $200 \text{ mg}$  vode, z natančnostjo  $0,1 \mu\text{g}$ , ker v sistem ne dodajamo joda, pač pa le-ta nastaja v sistemu iz jodidnih ionov (11, 16, 17, 18).

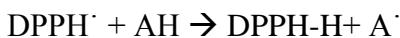


Slika 5: Shema aparature za koulometrično titracijo.

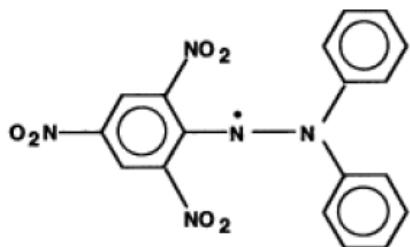
## 1.2 DPPH metoda

Kemijsko ime za DPPH je 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil ( $\alpha,\alpha$ -difenil- $\beta$ -pikrilhidrazil Slika 6). Nahaja se v obliki stabilnega radikala, ki ima delokalizirane proste elektrone po celotni molekuli in zato ne dimerizira kot večina ostalih radikalov. Delokalizacija je tudi odgovorna za vijolično barvo z absorpcijskim maksimumom pri valovni dolžini okoli 520 nm. Nahaja se v več kristaliničnih oblikah, ki se med seboj razlikujejo po simetriji rešetke in tališču. Komercialni reagent je mešanica vseh treh oblik (19, 20). Če DPPH raztopini dodamo antioksidant, ki donira vodikov atom, se DPPH pretvori v reducirano obliko (Slika 7), ki pa ni več vijoličnoobarvana, ampak svetlo rumene barve. Reakcijo zaznamo s padcem absorbance.

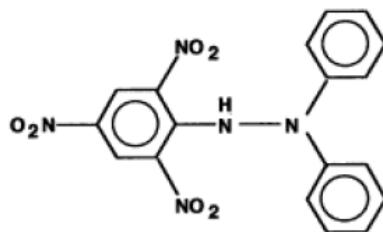
Mehanizem reakcije:



AH predstavlja molekulo antioksidanta, ki donira vodikov atom, A<sup>·</sup> je novo nastali radikal, ki v naslednji stopnji reagira z novo molekulo DPPH-ja.

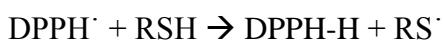


Slika 6: Difenilpicrilhidrazil v obliki radikala.



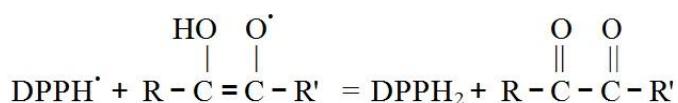
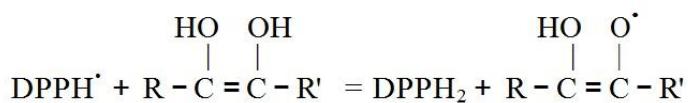
Slika 7: Difenilpicrilhidrazin.

DPPH metodo je odkril Marsden Blois pred skoraj 50 leti. Uporabljal je antioksidante, ki so vsebovali molekulo cistein. Ta reagira z molekulo DPPH v stehiometričnem razmerju 1:1 po sledeči reakciji.



RSH predstavlja cisteinsko molekulo. Novo nastali radikal RS<sup>·</sup> nadaljnje reagira s sebi enako molekulo, ki nastane z vzporedno reakcijo: RS<sup>·</sup> + RS<sup>·</sup> → RS-SR.

V primeru, da ima molekula dva donorja vodika (npr. askorbinska kislina), je stehiometrično razmerje 2:1. Ena molekula askorbinske kisline reducira dve molekuli DPPH-ja (Slika 8).



Slika 8: Mehanizem reakcije DPPH z molekulo, ki ima dva donorja vodika.

Enako stehiometrijo ima tudi reakcija s hidrokinonom (1,4-dihidroksibenzen), ki se pretvori v kinon (1,4-benzokinon). Z DPPH reagira tudi glutation, aromatski amini (npr. p-fenilen diamin in p-aminofenol), α-tokoferol (v stehiometričnem razmerju 2:1) in polihidroksi aromatske spojine (npr. hidrokinon in pirogalol), mono hidroksilnimi fenoli (npr. tirozin), enostavni sladkorji (npr. glukoza), piridini in pirimidini. Beljakovine se oborijo. Nekateri anorganski ioni nižjih valenc motijo reakcijo in jih je potrebno odstraniti, kar predvsem velja za železove ione. Najpogosteje uporabljeni topili, v katerih raztopimo

DPPH, sta metanol ali etanol, ker ne ovirata reakcije. Voda je kot topilo neuporabna, ker je DPPH v njej netopen (21). Meritve se izvajajo z uporabo standardne 1 cm kivete, z največjim volumnom 4 mL. Zaradi absorbcije v vidnem delu svetlobe je možna uporaba plastičnih kivet za enkratno uporabo, saj jih najpogosteje uporabljeni topili ne poškodujeta. Absorbanco merimo spektrofotometrično pri valovni dolžini med 515 nm in 520 nm. V originalni Blois-ovi metodi bi bilo potrebno vzdrževati pH v območju 5,0-6,5 z uporabo acetatnega pufra, vendar so kasnejše raziskave pokazale, da pH nima posebne vloge pri reakciji. Koncentracijo DPPH izberemo v območju med 50 in 100  $\mu\text{M}$  zato, da so absorbance referenčne raztopine manjše od 1,0. Priporočljiva je tudi uporaba standardov ali pozitivne kontrole skupaj z analiziranimi vzorci, da preverimo, ali metoda deluje pravilno. Pogosto uporabljeni standarda sta askorbinska kislina in  $\alpha$ -tokoferol. V originalni metodi je priporočen reakcijski čas 30 min, vendar nekateri znanstveniki uporabljujo tudi krajši reakcijski čas, kot je 5 ali 10 min. Pomembno je, da reakcija poteče do konca. Rezultate pri DPPH metodi lahko podajamo na različne načine. Eden izmed načinov je EC<sub>50</sub> ali IC<sub>50</sub> (koncentracijska učinkovitost). To je koncentracija antioksidanta, ki je potrebna za redukcijo 50 % DPPH (ki se kaže kot izguba intenzivnosti vijolične barve). Pomanjkljivost tega zapisa je, da je potrebno podati koncentracije DPPH-ja v raztopini, kar oteži primerjavo z drugimi vzorci. Z večanjem antioksidativne aktivnosti se zmanjšuje vrednost EC<sub>50</sub>. Drugi način je z izražanjem deleža inhibicije:

$$\text{Inhibicija (\%)} = \frac{(A_0 - A_c) \cdot 100}{A_0},$$

kjer je A<sub>0</sub> začetna absorbanca (slepi vzorec) in A<sub>c</sub> absorbanca po dodani koncentraciji vzorca. Tretji način je izračun razmerja med množino DPPH, ki ga reducira množina antioksidanta. Pri kompleksnih ekstraktih, kot so rastlinski ekstrakti, ne poznamo molske mase, zato podamo množino DPPH, ki reagira z antioksidanti v gramu ekstrakta. Reducirano množino DPPH izračunamo s pomočjo Beer-Lambertov zakona.

$$\Delta A = \epsilon \cdot c \cdot L \quad n_{\text{DPPH}} = c \cdot V_{\text{reakcijske zmesi}}$$

$$\Delta A = A_{\text{slepega vzorca}} - A_{\text{testnega vzorca}}$$

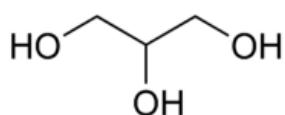
$\epsilon$  je molarni ekstinkcijski koeficient, ki v metanolu in etanolu pri 517 nm po literaturnih podatkih znaša med 11600 in 12500  $\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ , c koncentracija raztopine in L dolžina poti svetlobe skozi vzorec (ponavadi 1 cm).

DPPH metoda je uporabna za trdne in tekoče vzorce. Zaradi svoje hitrosti, enostavnosti in cenovne ugodnosti je široko uporabna (22, 23).

## 1.3 Topila

### 1.3.1 Glicerol

Kemijsko ime za glicerol ali glicerin je 1,2,3–propantriol (Slika 9).

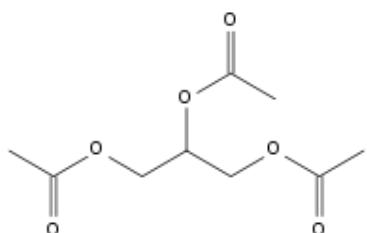


Slika 9: Molekula glicerola. (24)

Glicerol v svoji strukturi vsebuje tri hidroksilne skupine, ki so odgovorne za vezavo vode, njegovo higroskopno naravo in topnost v vodi. Pri sobni temperaturi je viskozna brezbarvna tekočina z gostoto 1,26 g/mL. Topen je v vodi in alkoholih, rahlo topen v etru, etilacetatu in dioksanu ter netopen v hidrokarbonatih. Taninom prepreči obarjanje v etanolnem izvlečku (24). Prisoten je v prehrani in sicer z oznako na embalaži E422 (25, 26). V organizmu povzroči nizko glikemično obremenitev. Akutna toksičnost je visoka in sicer LD<sub>50</sub>: 250 mg/kg. Zaradi vezave vode se uporablja v kozmetiki za krema in mila (24).

### 1.3.2 Glicerol triacetat

Kemijsko je triester glicerola in etanojske kisline (Slika 10), ki v telesu hitro hidroliza. Ima lastnosti glicerola in acetata (27).



Slika 10: Molekula glicerol triacetata. (28)

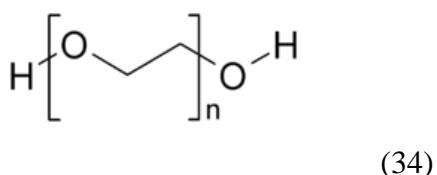
Je viskozna, brezbarvna tekočina, z gostoto 1,2 g/mL pri 25 °C. Topen je v alkoholu, rahlo topen v etru, karbon disulfidu in vodi, ter netopen v benzenu. Do sedaj ni znanih podatkov o toksičnosti pri ljudeh, pri podganah pa je peroralna toksičnost LD<sub>50</sub> 3000 mg/kg. V prehranski industriji se uporablja kot ohranjevalec vlage in plastifikator in se ga označuje z oznako E1518 (28, 29, 30, 31).

### 1.3.3 Capmul MCM®

Capmul MCM® je komercialno ime za zmes mono- in digliceridov kaprilne kisline. Pri visokih temperaturah je topen v vodi in oljih. Uporablja se za izdelavo stabilne emulzije in spremjanje viskoznosti (32, 33).

### 1.3.4 PEG 400

PEG je linearni polietileter sestavljen iz oksietilenskih enot (Slika 11). Številka poleg imena predstavlja povprečno molekulsko maso spojine (34).



(34)

Slika 11: Molekula PEG.

Je prozorna, viskozna tekočina. Ima močno izražene hidrofilne lastnosti. Dobro je topen v večini organskih topilih kot so benzen tetra kloro metanu, kloroformu, dimetil formamidu,

acetonitrilu, acetonu, alkoholih (metanolu), glicerolu, diklorometanu in aromatskih ogljikovodikih (35). Dobro je topen tudi v vodi, vendar se njegova topnost zmanjšuje z naraščanjem molekulske mase. Delno topen je v alifatskih ogljikovodikih ter netopen v dietiletru in heksanu. Pri ljudeh ima nizko toksičnost, pri podganah pa je znana LD<sub>50</sub> 30 mL/kg. V farmaciji se uporablja kot blago odvajalo (34, 36, 37, 38, 39, 40). Dokazano je bilo, da prehrana, ki vsebuje osmozna odvajala zmanjšuje pojavnost kolorektalnega raka. Protektivni učinek imajo na žalost le PEG z visoko molekulsko maso 8000 (41).

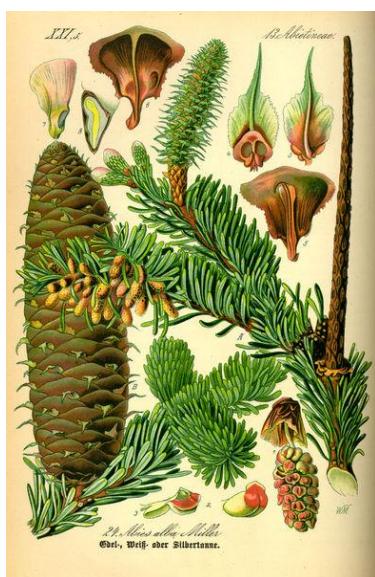
### 1.3.5 Oljčno olje

Oljčno olje je transparentno rumeno ali zeleno-rumene barve. Topno je v petroletru in praktično netopno v alkoholu. Sestavlja ga nasičene maščobne kisline (palmitinska, stearinska, miristinska kislina), enkrat nenasicičene maščobne kisline (oleinska kislina) ter večkrat nenasicičene maščobne kisline (linolna kislina,  $\alpha$ -linolenska kislina). Njegova gostota pri 20 °C je 0,9 g/mL, viskoznost pa 0,084 Pas (42, 43, 44, 45). Zaradi vsebnosti antioksidantov in maščobnih kislin ima pozitivne učinke na srce in ožilje, saj znižuje koncentracijo LDL, holesterola in triglyceridov ter zvišuje HDL. Antioksidanti zmanjšajo nastanek oksidiranega LDL, le-ta pa zmanjša proizvodnjo dušikovega oksida. V organizmu je višja koncentracija dušikovega oksida, ki deluje vazodilatorno in krvni tlak posledično pade (46). Izboljšuje prebavo, saj deluje kot laksativ. Lokalno je pogosto v uporabi tudi v kozmetiki za nego kože in las (42, 43, 44, 45). Vsebuje polifenolne spojine, ki iz olja prehajajo v želodčni sok in se tam lahko nahajajo tudi po več ur in vplivajo na *H. pylori*. Mehanizem, s katerim fenolne spojine vplivajo na rast *H. pylori* ni znan, vendar so predlagane teorije, da inhibira aktivnost ureaze, oteži oprijem bakterije na sluznico želodca ali zavira citokinazo, ki povzroča razvoj vnetja in razjede pri bolnikih. Znano je, da deluje močno baktericidno proti nekaterim okužbam s patogeni, ki se nahajajo v hrani kot je *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella*, *Salmonella enterica*. Oljčno olje vpliva tudi na zmanjšano izločanje kisline v prebavilih in posledično na zmanjšanje velikosti peptične razjede (47). Antioksidanti v oljčnem olju pri topikalni uporabi zmanjšujejo nastanek kožnega raka, saj zmanjšajo kancerogeni vpliv UVB žarkov. Epidemiološki podatki kažejo, da je pojavnost bolezni srca in ožilja ter nekaterih vrst raka (kot je rak prostate, dojke in debelega črevesja), nižje v sredozemskem območju, kjer se

redno uporablja oljčno olje. Fenolne spojine v oljčnem olju, ki delujejo antioksidativno so hidroksitirosol, oleuropein in skvalen (48).

## 1.4 Bela jelka

*Abies alba* ali bela jelka je iglavec, ki spada v rod *Abies* (jelka), družino *Pinaceae* (borovke), red *Pinales*, razred *Pinopsida*, deblo *Pinophyta* (iglavci). Spada med gorske drevesne vrste in raste na nadmorski višini nad 200 metri v srednji in južni Evropi. Zraste do višine 50 metrov lahko tudi več, debela pa je do 2 metra. Krošnja je stožčasta, valjaste ali jajčaste oblike. Značilnosti jelke so (Slika 12), da ima iglice ploske in v zgornjem delu krošnje zašiljene, v spodnjem delu pa na vrhu izrezane in na bolj zasenčenih vejah razporejene v dveh vrstah. Zgoraj so bleščeče zelene, spodaj pa imajo dve beli črti. Storži so pokončni in razpadajo na drevesu. Skorja je gladka in sivo bela s smolnatimi žlezami. Iglice so sploščene. Les je bele barve. Vsi deli jelke vsebujejo eterična olja, ki se uporabljajo v medicini, farmaciji in kozmetični industriji (49, 50). Lubje jelke vsebuje antiseptične in adstringentne snovi. Iglice se uporabljajo za izkašljevanje ter kot bronhialno pomirjevalo. Smola se uporablja kot antiseptik, diuretik, euppeptik, za izkašljevanje ter kot vazokonstriktor. V ljudski medicini se iglice in smola uporabljajo za zdravljenje bronhitisa ter razjed v črevesju. Smola je uporabna tudi za kopeli pri revmatičnih bolečinah in nevralgijah (51).



Slika 12: Značilnosti bele jelke.

## 1.5 Pycnogenol®

Pycnogenol® je ekstrakt pridobljen iz skorje francoskega obmorskega bora (*Pinus maritima*). Ta posebna skorja je bogata z flavonoidi, ki delujejo kot antioksidanti in kovinski kelatorji. Sestava ekstrakta še ni popolnoma jasna, vemo pa, da ga sestavljajo flavonoidi, procianidini, katehini, taksoferoli in fenolne kisline. Spojine v ekstraktu Pycnogenola® med seboj delujejo sinergistično (52, 53, 54, 55, 56). Izboljša delovanje žilne stene ter posledično izboljša pretok krvi skozi tkiva, uravnava povišan krvni tlak, saj inhibira aktivnost encima angiotenzin konvertaze in preprečuje zlepljanje krvnih ploščic. Na žilno steno deluje preko dušikovega oksida, ki je žilni mediator. S starostjo se sinteza dušikovega oksida zmanjša, Pycnogenol® pa spodbudi sintezo. Dušikov oksid poleg preprečevanja zlepljanja krvnih ploščic razširi svetlico žile in posledično zniža sistolični krvni tlak, medtem ko na diastoličnega nima vpliva. Učinki Pycnogenola® na žilni sistem so dokazani z dvojno slepo, randomizirano ter navzkrižno študijo. Zaradi izboljšane prekrvavitve ugodno vpliva na ledvice, zvonjenje v ušesih, bolečine v nogah,vensko insuficienco, retinopatijo pri sladkornih bolnikih ter motnjah erekcije (52, 53, 54, 55, 56, 57, 58). Uravnava krvno koncentracijo holesterola ter zmanjšuje oksidacijo LDL holesterola ter maščob (53). Antioksidativni učinek Pycnogenola® ugodno deluje pri astmi in bronhitisu, saj je v teh stanjih prisotno kronično vnetje. Ugodni učinki so tudi pri športnikih in psihično obremenjenih ljudeh, saj so izpostavljeni oksidativnemu stresu in radikalom (52, 53, 55, 56, 57). Organizem ščiti pred oksidativnim stresom, saj poleg vsebnosti antioksidantov regenerira askorbinski radikal in endogeni vitamin E ter glutation (54).

Na Slovenskem trgu so prisotne tablete z 20, 50 in 100 mg Pycnogenola®. Priporočen dnevni odmerek je 1 mg Pycnogenola® na kg telesne teže, priporoča se najmanj 2-3 mesečna terapija (55). Pri uživanju ni znanih stranskih učinkov. Potrebna pa je pazljivost pri ljudeh z avtoimunimi boleznimi kot so multipla skleroza, sistemski lupus, revmatoidni artritis, saj povečana aktivnost imunskega sistema lahko poslabša bolezen. Poleg tablet je na trgu prisoten še Pycnogenol® gel, ki neguje in ščiti kožo pred prezgodnjim staranjem, predvsem zaradi sončenja. Veže se na kolagenska in elastinska vlakna in jih varuje pred radikali in razgradnimi encimi kot sta kolagenaza in elastaza. Zaradi izboljšane prekrvavitve izboljša izgled kože in ji da zdrav videz (56).

## 1.6 Izvleček lubja bele jelke

Na Fakulteti za farmacijo so iskali alternativni vir za pridobivanje ekstrakta, podobnega Pycnogenol®-u. Z njim so primerjali ekstrakte lubij navadne smreke in navadne jelke. Lubji obeh iglavcev sta lažje dostopni in cenovno ugodnejši, saj sta odpadna produkta pri predelavi lesa. Po diplomski nalogi Valentine Mravljak je imel ekstrakt lubja navadne smreke 0,6-krat, ekstrakt lubja navadne jelke pa kar 1,6-krat višjo antioksidativno učinkovitost kot Pycnogenol®. Kromatogram ekstrakta navadne jelke je bil bolj primerljiv s Pycnogenol®-ovim kot kromatogram ekstrakta navadne smreke (59). Z HPLC in TLC analizami so potrdili, da oba ekstrakta vsebujeta katehin in epikatehin (60). Ekstrakt navadne jelke se je torej izkazal za boljši alternativni vir.

Za pripravo kar najučinkovitejšega ekstrakta so preizkušali različna organska topila, kot so aceton, etanol, brezvodni etilacetat, brezvodni metilacetat in etilacetat. Ugotovili so, da je etilacetat najustreznejše topilo, saj je pri ostalih topilih nastalo premalo ekstrakta, ali pa je imel prenizko antioksidativno učinkovitost. Spremenjeni ekstrakcijski pogoji, kot sta temperatura in čas, niso izboljšali kvalitete ekstraktov (61).

Ovrednotili so tudi različne metode za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti. Izbrani metodi z dobro dnevno in meddnevno ponovljivostjo sta bili: DPPH metoda in metoda za določanje reducirane moči antioksidanta, kjer antioksidant reducira kalijev ferocijanid ( $\text{Fe}^{3+}$ ) v kalijev ferocijanid ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Manj ustrezne metode pa so bile: metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi-D-ribozo, z  $\beta$ -karotenom, s tiocianatom, z NADH in ABTS metoda (62).

,

## 2. Namen dela

Namen našega dela bo vrednotiti različna topila in njihovih zmesi za raztopljanje fenolov iz lubja jelke. PEG-ov ekstrakt jelkinega lubja bi zaradi njegove antioksidativne učinkovitosti lahko uporabljeni v prehranskih dopolnilih, vendar ima neželen, rahlo odvajalni učinek. Testirali bomo hidrofilno in lipofilna topila, ki so tehnološko najpogosteje uporabljena:

- glicerol
- dolgoverižni (dv) mešani gliceridi
- glicerol triacetat
- Capmul MCM®

Ekstraktom bomo določali naslednje lastnosti:

- volumen ekstrakta (preverili bomo učinkovitost odparevanja etilacetata),
- antioksidativni potencial z DPPH metodo (preverili bomo spodobnost topila za sprejemanje antioksidantov),
- HPLC kromatograme (primerjali bomo sestavo ekstraktov),
- vsebnost vode z novo izvedbo Karl Fisher-jeve metode, saj potenciometrična in kolumnična metoda zahtevata specializirano opremo, volumetrična metoda pa ni primerna za obarvane vzorce.

Razvili in validirali bomo modificirano volumetrično Karl Fischer-jevo titracijo, pri kateri bomo tekom celotne titracije s spektrofotometrom merili absorbanco in končno točko titracije ugotavljeni s presečiščem titračijskih premic. Ta metoda bo omogočila merjenje vsebnosti vode v obarvanih izvlečkih.

## 3. Materiali in metode

### 3.1 Rastlinski material

Uporabljali smo tekoči PEG ekstrakt lubja navadne jelke in posušen vodni ekstrakt lubja navadne jelke. Tekoči izvleček iz lubja bele jelke je bil pridobljen po postopku dvostopenjske ekstrakcije. 5 kg zmletega lubja bele jelke (*Abies alba*) so v prvi stopnji ekstrahirali s 25 L vode pri 70 °C, dve uri. Vodni izvleček so pri znižanem tlaku uparili do volumna 5 L. V drugi stopnji ekstrakcije so koncentriran vodni izvleček ekstrahirali s 3-krat po 3 L etilacetata. Etilacetatnemu izvlečku so dodali 25 mL PEG 400 in iz zmesi odparili etilacetat. Pridobili so 50 mL rjavo-rumenega viskoznega izvlečka z vonjem po smoli.

Posušen vodni izvleček je bil pridobljen tako, da so 5 kg zmletega lubja bele jelke (*Abies alba*) ekstrahirali s 25 L vode pri 70 °C, dve uri. Vodni izvleček so pri znižanem tlaku uparili do volumna 5 L, ter ga nato posušili s sušenjem z razprševanjem.

### 3.2 Kemikalije

- acetonitril LICHROSOLV® za HPLC (100030), Merck (Darmstadt, Nemčija),
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (D913-2), Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija),
- etanol, 96 % (ALK133124), Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija),
- etilacetat (45760), Fluka (Buchs, Švica),
- metanol (414816), carlo Erba reagenti (Milano, Italija),
- trifluoroocetna kislina (411561), Carlo Erba reagenti (Milano, Italija),
- voda LICHROSOLV® za HPLC (1.15333), Merck (Darmstadt, Nemčija),
- glicerol (453752) carlo Erba reagenti (Milano, Italija),
- PEG 400 (142436.1214) PRS Panreac (Barcelona, Španija),
- Hydralal®-solvent E (34730) Fluka, Sigma-aldrich (Steinheim, Nemčija),

- Hydralal®-titrant 5E (34732) Fluka, Sigma-aldrich (Steinheim, Nemčija),
- Hydralal®-Standard 5.00 (34813) Fluka, Sigma-aldrich (Steinheim, Nemčija),
- Vileda zaščitne rokavice velikosti S (Weinhem, Nemčija),
- oljčno olje,
- dv mešani gliceridi,
- Capmul MCM®,
- glicerol triacetat.

### 3.3 Aparature in oprema

- analizna tehnicka ALS 120-4, Kern (Balingen, Nemčija),
- avtomatske pipete Biohit-Proline, Biohit (Helsinki, Finska),
- centrifuga Centric 400R, Tehnica (Železniki, Slovenija),
- digestorij Variolab Mobilien W90, Waldner (Wangen, Nemčija),
- hladilnik, +5°C, Liebherr (Biberachander Riss, Nemčija),
- HPLC: 20 ADXR, DGU-20A5, SIL-20AC XR, CTO-20AC, SPD-M20A, CBM-20A, FRC-10A, Shimadzu (Kyoto, Japonska),
- HPLC analizna kolona: Kinetex C-18 4,6 x 100 mm, 2,6 um, Phenomenex (Torrance, Kalifornija, ZDA),
- magnetno mešalo Rotamix 606MM, Tehnica (Železniki, Slovenija),
- mlinček Commercial Blender HGB200, Waring (New Hartford, Connecticut, ZDA),
- nastavki za pipete, Saerstedt (Numbrecht, Nemčija),
- tehnicka XS205, Mettler (Greifensee, Švica),
- UV/VIS spektrofotometer Lambda Bio+, Perkin Elmer (Massachusetts, ZDA),
- rotavapor R-200, Buechi, (Flawil, Švica),

- centrifuga 5804 R, Eppendorf (Hamburg, Nemčija),
- mini centrifuga LMSLMS CO., LTD (Tokio, Japonska),
- dvojni rotavapor: črpalka V-800, vodna kopel B-480, Buechi (Flawil, Švica).

## 3.4 Metode

### 3.4.1 Analizna HPLC

#### Analizne razmere HPLC:

Volumen injiciranja vzorcev: 10 µL

Mobilni fazi:

A: voda + 0,1 % TFA (trifluoroocetna kislina)

B: acetonitril (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

Kolona: Phenomenex Kinetex RP-18 100 X 4,6 mm

Temperatura kolone in detektorja: 40 °C

Kromatografski sistem: Shimadzu Prominence: DGU-20A5, LC-20AD XR, SIL-20AC, CPO-20AC, SPD-M20A, CBM-20A

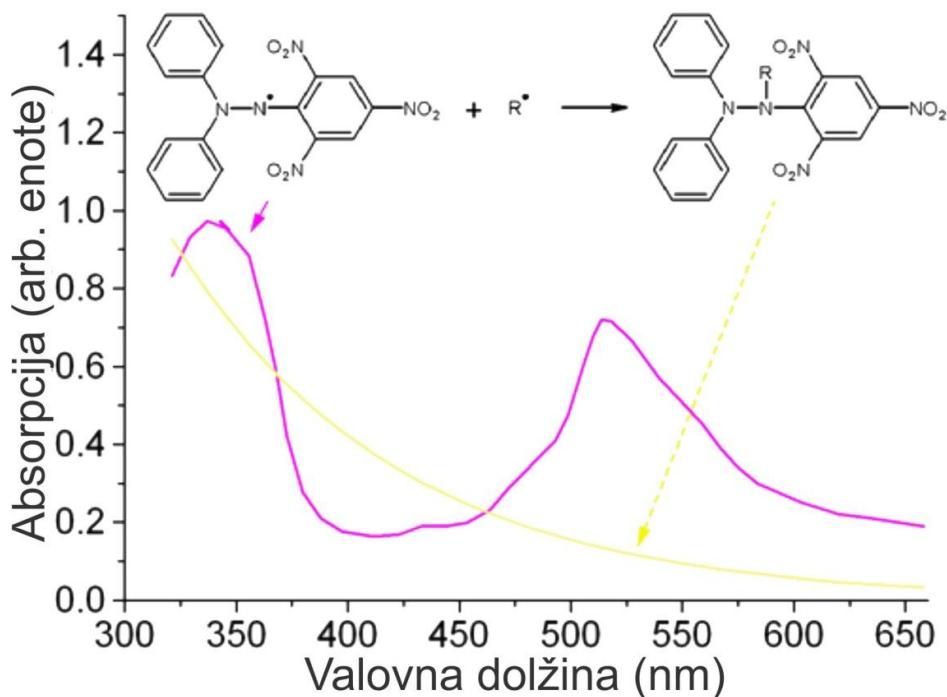
## Priprava vzorcev

100  $\mu\text{L}$  vzorca ekstrakta, ki smo ga predhodno stehiali, smo 10-krat redčili z vodo. Centrifugirali smo ga 3 minute pri 5000 obratih/minuto, filtrirali skozi membranski filter (0,22  $\mu\text{m}$ ) in analizirali. Testirali smo vzorce vsakega topila po vsakem nasičenju.

Z analizno metodo smo posneli kromatograme ekstraktov v različnih topilih in raztopine PEG ekstrakta s čistim glicerolom, glicerolni ekstrakt s čistim PEG 400 ter mešanico PEG in glicerolnega ekstrakta.

### 3.4.2 DPPH metoda

DPPH je vijolično obarvan radikal, ki absorbira pri 517 nm. Če DPPH raztopini dodamo antioksidant, ki donira vodikov atom, se pretvorji v reducirano obliko (Slika 13), ki pa ni več vijolično obarvana, ampak svetlo rumene barve. Reakcijo zaznamo s padcem absorbance (19).



Slika 13: Graf absorpcije DPPH glede na valovno dolžino svetlobe.

(24)

Stehiometrija reakcije je odvisna od antioksidanta in njegove sposobnosti doniranja vodikovih atomov. Antioksidativni potencial smo izračunali po enačbi:

$$\text{AOP} = \frac{n(DPPH)}{m(vzorca)} = \frac{(A(slepa) - A(vzorec)) \cdot V( skupni )}{\varepsilon \cdot l \cdot c(vzorca) \cdot V(vzorca)}$$

Slepi vzorec predstavlja 180 µL destilirane vode,  $\varepsilon$  je molarni ekstinkcijski koeficient, ki v

metanolu pri 517 nm znaša 1200  $\frac{L}{mol \cdot c}$

### 3.4.3 Karl Fischer-jeva metoda z uporabo Hydranal® kompleta

Določanje vlage s potenciometrično ali koulometrično Karl Fisher-jevo metodo je zaradi zahtevne in specializirane opreme drago. Odločili smo se za volumetrično določanje vlage s Hydranal® kompletom, ki vsebuje vso opremo in reagente. Končna točka titracije se določi s spremembo barve iz brezbarvne v rumeno. Prednost Hydranal® reagentov, ki jih je leta 1979 odkril dr. Eugen Scholz je, da kot bazo namesto piridina vsebujejo imidazol. S to zamenjavo se je znebil neprijetnega vonja, ki ga ima piridin. Reakcija je hitra, končna točka je stabilna, rezultati so natančni in reagenti imajo dolg rok uporabnosti (63).

Hydranal® komplet je sestavljen iz treh reagentov: Hydranal® topila E (ki ga sestavlja imidazol, žveplov dioksid in dietanolamin), Hydranal® titranta E (ki vsebuje jod) in Hydranal® standarda (s točno znano vsebnostjo vode). Poleg reagentov vsebuje tudi stekleničko z nepropustnim pokrovčkom z gumo, ki se lahko prebada z injekcijo ter injekcijske brizge z iglami. Po navodilih proizvajalca smo v stekleno posodico odmerili 20 mL Hydranal® topila, dodali magnetno mešalo in tesno zaprli s pokrovčkom, ki je imel na vrhu gumo za prebadanje z injekcijo. Vse skupaj smo postavili na magnetno mešalo in počasi z 1 mL injekcijo dodajali Hydranal® titrant do preskoka barve iz brezbarvne v rumeno. S tem smo nevtralizirali vlago v topilu. Z novo 1 mL injekcijo smo dodali znano količino vzorca. Raztopina se je razbarvala, saj smo v posodico vnesli vodo. Ponovno smo titrirali s Hydranal® titrantom do preskoka barve in zabeležili volumen Hydranal® titrnega reagenta, ki je bil potreben za nevtralizacijo vzorca. Za izračun vode v vzorcu smo potrebovali določiti tudi vodo v standardu (titre - standardizirali smo Hydranal® titrant). Načeloma je reagent, ki je v originalni steklenici stabilen vsaj 3 leta, vendar lahko pri pogosti uporabi zračna voda reagira z reagentom in posledično zmanjša učinkovitost

reagenta. Standardizacijo reagenta smo izvedli po enakem postopku kot določevanje vode v vzorcu, le da smo namesto vzorca dodali 0,5 mL Hydral® standard 5,00 (63).

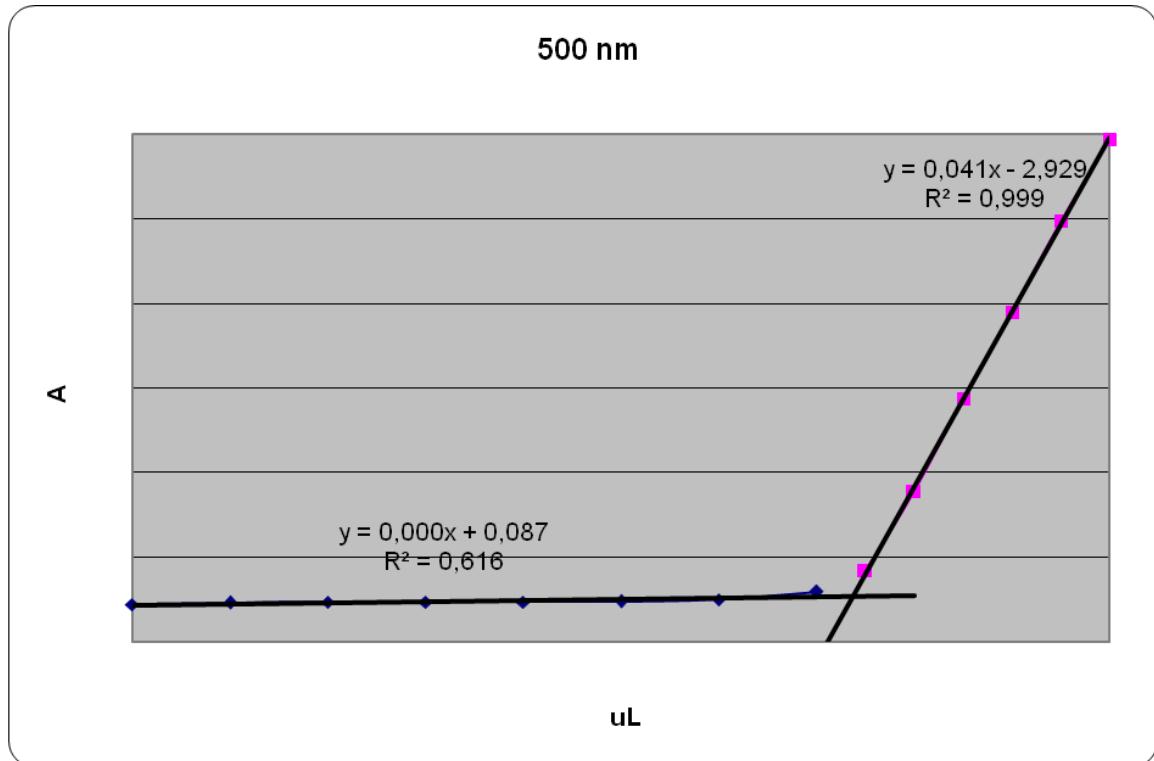
Enačba za izračun titra:

$$\text{Titre (mg H}_2\text{O/mL)} = \frac{(\text{voda v standardu (mg/mL)} \cdot V (\text{standarda-mL})}{(V (\text{porabe titrantna-mL}))}$$

Enačba za izračun vode v vzorcu:

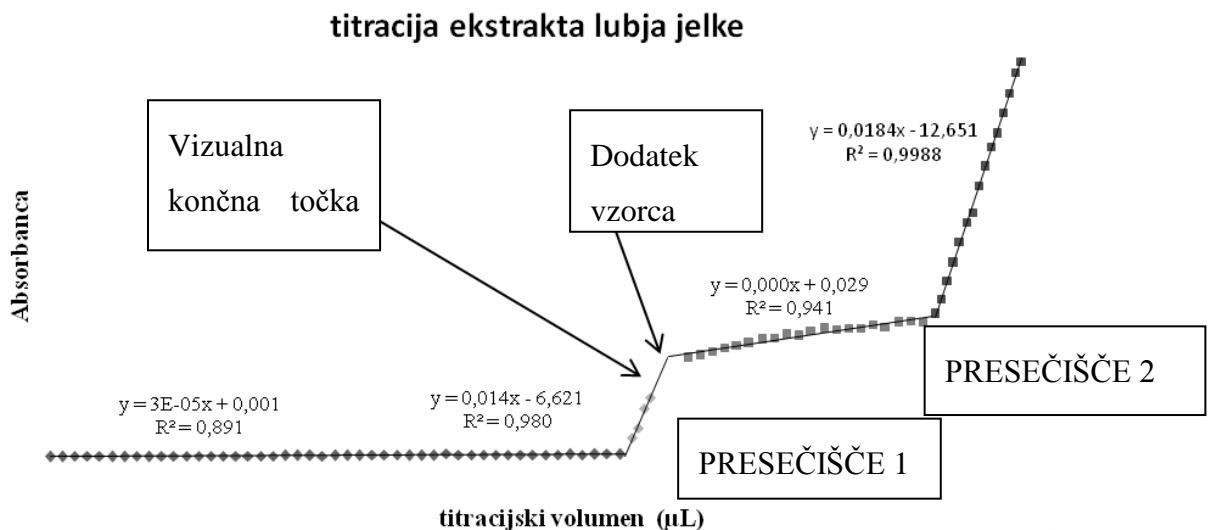
$$\text{Koncentracija (\%)} = \frac{V (\text{poraba titranta-mL}) \cdot \text{titre} \left( \frac{\text{vode}}{\text{mL}} \right) \cdot 100}{V (\text{vzorca-uL})}$$

S proizvajalčevim postopkom je mogoče analizirati le brezbarvne vzorce. Ekstrakti lubja jelke so temno rjavo obarvani in prekrijejo preskok barve v rumeno. Vizualno se spremembe barve ni zaznalo, zato smo prešli na idejo o uporabi spektrofotometra, saj je na spremembo barve bolj občutljiv kot človeško oko. Metodo smo prilagodili volumnu kivete. Nevtralizacijo topila smo zaznali vizualno, ob dodatku vzorca smo merili absorbanco pri 420, 440, 460, 480 in 500 nm. Za ozadje absorbance smo uporabili Hydral® topilo. Hydral® titrant smo dodajali po 10  $\mu\text{L}$ , v bližini ekvivalentne točke smo dodatek zmanjšali na 5  $\mu\text{L}$ . Po vsakem dodatku smo izmerili absorbanco. Za določitev ekvivalentne točke je bila potrebna grafična obdelava podatkov. S pomočjo programa Microsoft Excel smo narisali premici (Graf 1). Absorbanca se do ekvivalentne točke ni veliko spremenjala, zato je bila premica skoraj vodoravna. Po preskoku ekvivalentne točke se je absorbanca enakomerno strmo povišala. Stičišče obeh premic je iskana ekvivalentna točka, ki smo jo določili s pomočjo funkcij Slope in Intercept v programu Microsoft Excel.



Graf 1: Določanje vlage v standardnem PEG ekstraktu pri 500 nm dne 5.7.2011.

Metoda ni bila točna in natančna. Možna napaka je bila pri nevtralizaciji Hydranal® topila, saj človeško oko ni tako natančno kot spektrometer, zato smo tudi pri nevtralizaciji Hydranal® topila uporabili spektrofotometrično določitev končne točke. V kiveto smo odmerili Hydranal® topilo in posneli ozadje pri 520 nm. To valovno dolžino smo si izbrali, ker omogoča merjenje tudi po 50  $\mu\text{L}$  presežku Hydranal® titranta, medtem ko je pri nižjih valovnih dolžinah absorbanco previsoka za merjenje. Absorbanco smo merili po vsakem 10  $\mu\text{L}$  dodatku Hydranal® titranta do treh vrednosti, ki so odstopale od ničle. Dodali smo znano količino vzorca in ponovno merili absorbance po 5 ali 10  $\mu\text{L}$  dodatkih Hydranal® titranta. S pomočjo Microsoft Excela smo narisali premice (Graf 2). Presečišče med prvo in drugo premico predstavlja volumen Hydranal® titranta za nevtralizacijo Hydranal® topila pred dodatkom vzorca. Presečišče med tretjo in četrto premico ustreza volumnu Hydranal® titranta za nevtralizacijo vode v Hydranal® topilu in vzorcu. Razlika med drugim in prvim presečiščem je volumen Hydranal® titranta, potrebnega za nevtralizacijo vzorca.



Graf 2: Odvisnost absorbance od titracijskega volumena.

Teoretična meja zaznavnosti metode je prikazana s Preglednico I. Priporočena količina vzorca glede na vsebnost vode. Majhni volumni Hydralan® titranta imajo višjo relativno napako, maksimalni volumen Hydralan® titranta pa omejuje volumen kivete.

Preglednica I: Dodatek vzorca glede na vsebnost vlage.

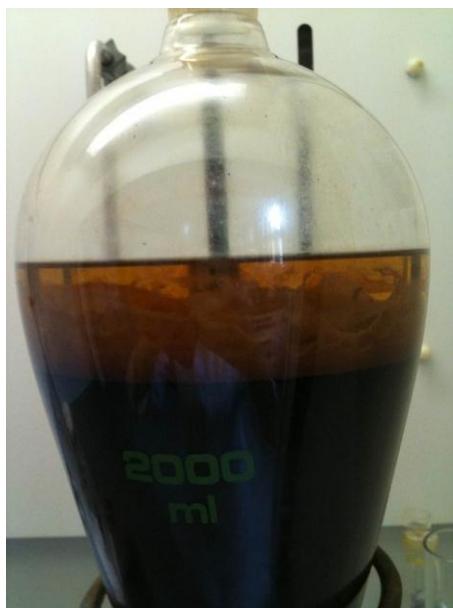
Vsebnost vode (%)	Volumen vzorca ( $\mu\text{L}$ )	Poraba titranta ( $\mu\text{L}$ )
5 – 25	5	50 - 250
2,5 – 12,5	10	50 - 250
1,25 – 6,25	20	50 - 250
0,62 – 3,12	40	50 - 250
0,31 – 1,56	80	50 - 250
0,21 – 1,04	120	50 - 250
0,16 – 0,78	160	50 - 250
0,10 – 1,04	120	25 - 250

## 4. Eksperimentalno delo

### 4.1 Priprava ekstrakta

Iz posušenega vodnega ekstrakta smo pripravili etilacetatni ekstrakt in z njim preizkusili uporabnost različnih topil. Suh, sprijet vodni ekstrakt smo s pomočjo mlinčka zmleli v prah. 150 g uprašenega ekstrakta smo s pomočjo magnetnega mešala raztopili v 1500 mL destilirane vode. Vodni izvleček smo trikrat ekstrahirali s 500 mL etilacetata. Vsakokrat smo ekstrakcijsko zmes pustili stati celo noč, da sta se fazi čim bolj ločili. Kot je iz Slik 14 in 15 razvidno, se fazi kljub temu nista popolnoma ločili. Etilacetatno fazo smo nato razdelili na 5 delov po 200 mL, vsak del za svoje topilo. K 4 mL testiranega topila smo dodali 40 mL etilacetatnega izvlečka, odparili pri znižanem tlaku in temperaturi 40 °C in odvzeli 100 µL vzorca, ki smo ga tudi stehtali. Postopek smo še 4-krat ponovili s preostalimi deli etilacetatnega izvlečka.

Uporabili smo naslednja topila: PEG 400, glicerol, dv mešani gliceridi, Capmul MCM® in glicerol triacetat.

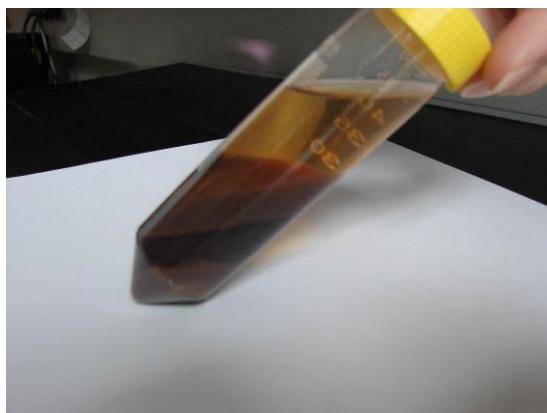


Slika 14: Ekstrakcija vodnega izvlečka etilacetatnim topilom.

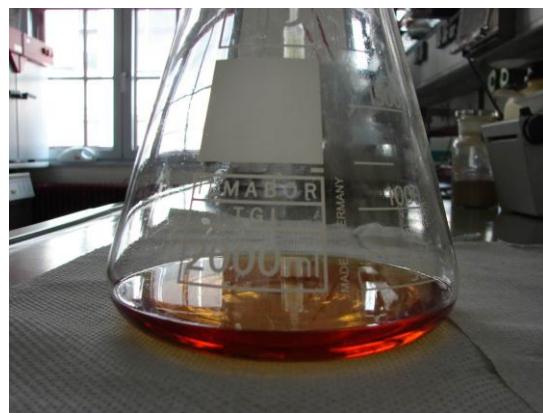


Slika 15: Etilacetatni izvleček z vsebnostjo vode (necentrifugirani etilacetatni izvleček).

Pri ekstrakciji z etilacetatom je nastala emulzija. Pri prvi pripravi ekstrakcije smo fazi ločili le s pomočjo lija ločnika. S takšno ločitvijo faz smo v etilacetatno fazo vnesli tudi velik del vodnega izvlečka. Pri drugi pripravi ekstrakcije smo se želeli popolnoma znebili vodnega ekstrakta s pomočjo centrifugiranja vendar to ni bilo možno saj se v etilacetatu pri 20 °C topi 8 % vode. V centrifugirki sta se fazi ločili (Slika 16) in preizkus topil smo izvajali z etilacetatno fazo, ki vsebuje manj vode kot etilacetatna faza ločena z lij ločnikom (Slika 17).



Slika 16: Centrifugirani etilacetatni izvleček.



Slika 17: Čisti etilacetatni izvleček.

## 4.2 Volumen ekstrakta

Topilo, ki smo mu 5-krat dodali etilacetatni izvleček in odparili etilacetat, smo odpipetirali s pipeto iz bučke in sočasno izmerili volumen.

## 4.3 DPPH metoda

Antioksidativni potencial topil smo merili spektrofotometrično z DPPH metodo. Dnevno sveže smo pripravili DPPH reagent v metanolu s koncentracijo 0,04 mg/mL. Raztopino smo zavili v alu-folijo in hranili do uporabe v hladilniku, saj na svetlobi hitro razpada.

Vzorce smo po testiranju s HPLC dodatno 10-krat redčili in jih uporabili za merjenje antioksidativnega potenciala. 180 µL dodatno rečenemu vzorcu smo dodali 4,50 mL raztopine DPPH, ga dobro premešali in pustili reagirati 30 min, zaščitenega pred svetlobo.

Slepi vzorec je bila reakcijska zmes 180 µL destilirane vode in 4,50 mL DPPH raztopine.

Spektrofotometer smo kalibrirali z metanolom in vzorce pomerili pri 517 nm.

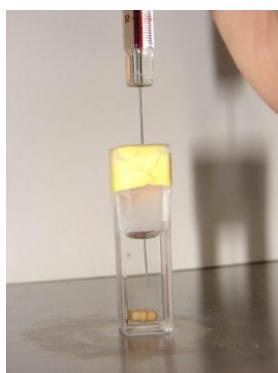
Antioksidativni potencial smo izračunali po enačbi:

$$AOP = \frac{n(DPPH)}{m(vzorca)} = \frac{(A(slepa) - A(vzorec)) \cdot V(skupni)}{\varepsilon \cdot l \cdot c(vzorca) \cdot V(vzorca)}$$

Izmerili smo antioksidativni potencial za vsako topilo po vsakem nasičenju.

## 4.4 Določanje vode s Karl Fischer-jevo metodo

Vsebnost vode v ekstraktih smo določali z modificirano Karl Fischer-jevo metodo, saj smo končno točko določili s pomočjo spektrofotometra. V kiveto smo odmerili 2 mL Hydralal® topila in dodali magnetno mešalo. S kosom gume, ki smo jo izrezali iz gumijaste rokavice in z lepilnim trakom smo kiveto neprepustno zaprli (Slika 18). S 100 µL injekcijo smo dodajali Hydralal® titrant do preskoka barve topila iz brezbarvne v rumeno. Z novo 100 µL injekcijo smo v kiveto vnesli 10 µL vzorca in pomerili absorbanco pri 420, 440, 460, 480 in 500 nm. Nato smo do ekvivalentne točke dodajali Hydralal® titrant v korakih po 10 µL in vsakokrat pomerili absorbanco. V bližini in po ekvivalentni točki pa smo dodajali le po 5 µL. Ekvivalentno točko smo določili grafično s stičiščem obeh premic.



Slika 18: Prikaz izvedbe modificirane Karl Fischer-jeve metode.

Zaznavo nevtralizacije Hydralal® topila smo izboljšali z uporabo spektrofotometra namesto vizualne ocene. Absorbanca Hydralal® topila pri 520 nm je služila za ozadje. Po vsakem dodatku 10 µL Hydralal® titranta smo izmerili absorbanco, do treh višjih

absorbanc. Nato smo dodali znani volumen vzorca in merili absorbanco po vsakokratnem 10 µL dodatku Hydranal® reagenta, do pretitracije vzorca. Ekvivalentno točko smo določili z odštetim volumnom presečišča tretje in četrte premice od presečišča prve in druge premice. Pri izvedbi meritev je zelo pomembna izolacija topila in vzorca od zunanje vlage. Najbolj učinkovita je bila lateks Vileda rokavica, ki je debelejša in je injekcijska igla ne raztrga. Najustreznejša valovna dolžina je 520 nm, saj nam omogoča merjenje absorbance tudi po 50 µL presežka titranta, medtem ko je pri nižjih valovnih dolžinah absorbanca prevsoka.

## 4.5 Redčenje PEG ekstrakta

PEG ima na organizem fiziološko delovanje in sicer kot odvajalo, zato smo nameravali zmanjšati količino le-tega in ga nadomestiti z drugimi topili. Redčili smo ga z dv mešanimi gliceridi, glicerol triacetatom, glicerolom in olivnim oljem. PEG ekstraktu smo dodajali ostala topila v razmerjih 75:25, 50:50 in 25:75. Pripravljeno zmes smo dobro premešali na mešalniku vorteks in 30 min centrifugirali pri 3000 obratih. Opazovali smo zmes in kontrakcijo volumna.

## 5. Rezultati in razprava

### 5.1 Volumen ekstrakta

Ekstrakte z različnimi topili, pripravljene po postopku, opisanem v poglavju 4.1 smo pripravljali dvakrat. Prvič smo etilacetatno fazo in vodni izvleček ločili le s pomočjo lija ločnika. V etilacetatni fazi je nastala emulzija. Posledično smo v končne zmesi vnesli veliko količino vode, ki pa je nismo mogli odpariti pod znižanim tlakom. Volumni ekstraktov, predstavljeni v Preglednici II so zato previsoki na račun vode. Pričakovani rezultati bi bili okoli 4 mL, kar ustreza količini topila, ki smo ga dodali v bučko, če bi etilacetatno fazo odparili pri znižanem tlaku.

Preglednica II: Volumen ekstraktov pri prvem poizkusu, kjer smo fazi ločili z lij ločnikom.

Topilo	Volumen (mL)
Glicerol 85 %	9
Capmul MCM®	19,5
PEG 400	37,9
Glicerol triacetat	39,3
Dv mešani gliceridi	54,5

Pri ponovni pripravi ekstraktov smo uporabili etilacetatno fazo brez emulgirane vode, zato smo etilacetatno fazo po ločitvi z lijem ločnikom centrifugirali, da smo popolnoma ločili emulzijo. K 4 mL topila smo dodajali pet dodatkov po 40 mL etilacetatne faze in odparili topilo pri znižanem tlaku in 40 °C. Vsakokrat smo odvzeli tudi 100 µL vzorca za nadaljnje analize. Pričakovani volumni ekstrakta so torej 3,5 mL, saj smo 5-krat odvzeli 100 µL vzorca. Volumni topil druge priprave so predstavljeni v Preglednici III. Do odstopanj od 3,5 mL je lahko prišlo pri merjenju volumna, saj je nekaj ekstrakta vedno ostalo adheriranega na steklovino. Višji volumni so lahko posledica močne vezave etilacetata, ki ga posledično nismo odstranili z odparevanjem, ali pa je k temu prispevala voda, raztopljena v etilacetatu. Namesto 85 % glicerola, ki smo ga uporabili pri prvi pripravi, smo uporabili 100 % glicerol, saj nas je zanimal vpliv čistega glicerola.

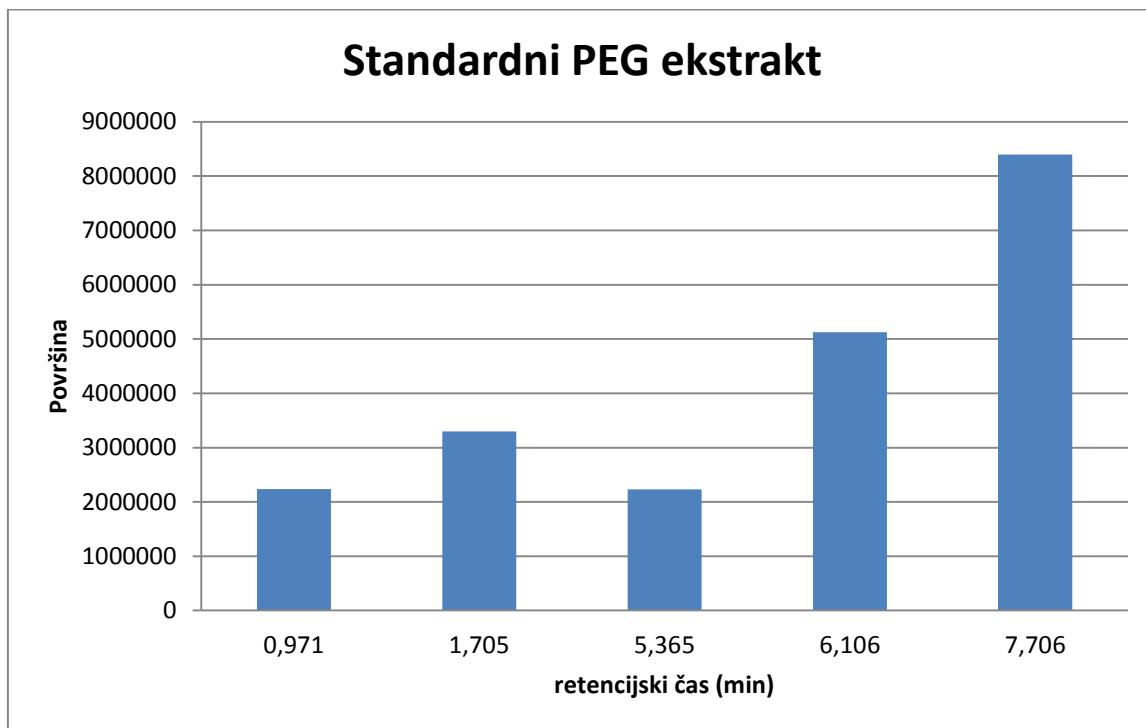
Preglednica III: Volumen ekstraktov po drugem poizkusu, kjer smo fazi ločili s pomočjo centrifugiranja.

<b>Topilo</b>	<b>Volumen (mL)</b>
Capmul MCM®	3,2
Dv mešani gliceridi	3,45
PEG 400	3,6
Glicerol triacetat	4,35
Glicerol 100 %	4,6

## 5.2 HPLC analiza

HPLC kromatograme smo vrednotili glede na 5 najvišjih vrhov in jih grafično predstavili s stolpcnimi diagrami, kjer je na osi y površina pod krivuljo vrha, na osi x smo navedli vrhove glede na njihov retencijski čas v min.

Rezultate naših ekstraktov smo primerjali z standardnim PEG ekstraktom (Slika 19), ki izkazuje najvišji antioksidativni potencial.

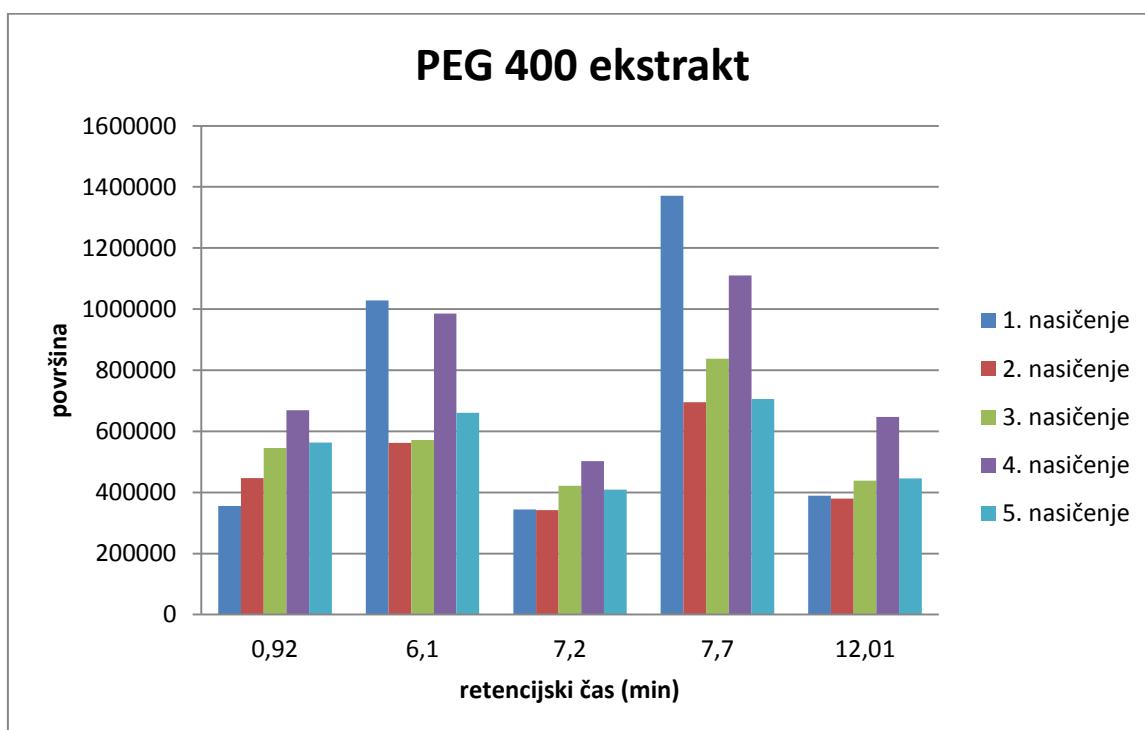


Slika 19: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za standardni PEG ekstrakt.

### Rezultati prve priprave ekstrakta, kjer smo fazi ločili z lij ločnikom

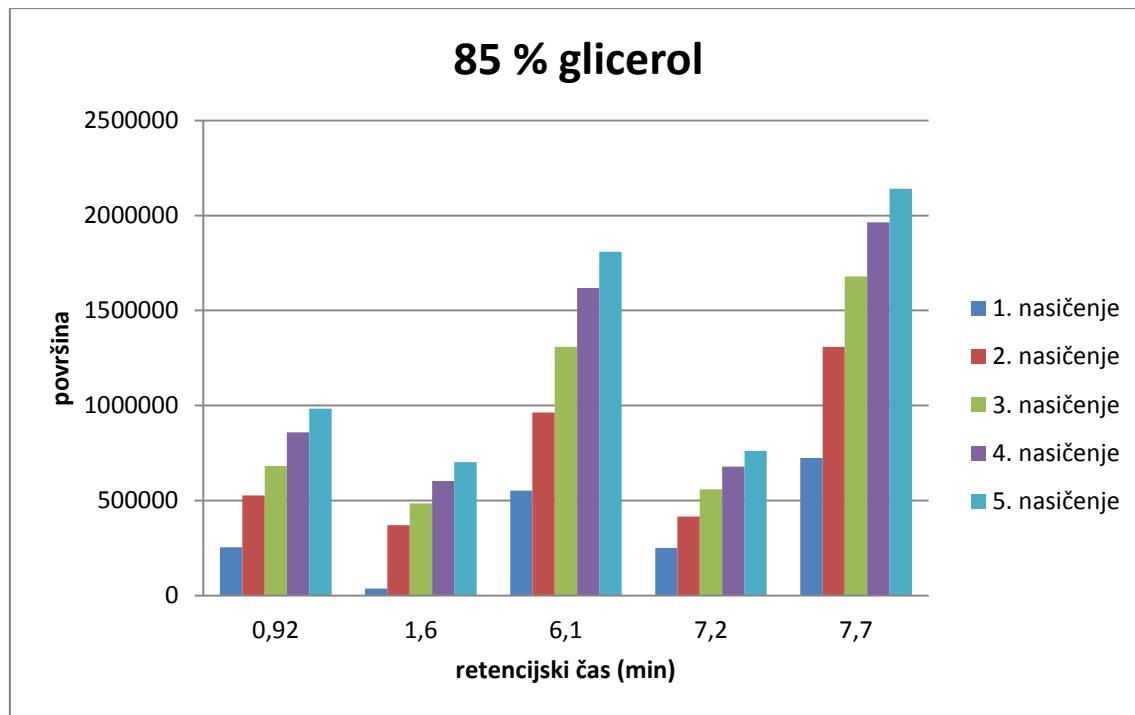
HPLC analizo smo izvedli za vsak vzorec, po vsakem nasičenju z etilacetatno fazo. Vseh pet nasičenj s petimi najvišjimi vrhovi smo predstavili v skupnem stolpčnem diagramu.

Pri pripravi ekstraktov smo po vsakem nasičenju z etilacetatno fazo pričakovali večjo vsebnost spojin v topilu. Pri PEG ekstraktu (Slika 20) je prisotno nihanje površin vrhov, kar lahko razložimo s težavnim pipetiranjem ekstrakta, ki je bil zelo viskozen. Standardni PEG ekstrakt ima približno 4-krat višjo vsebnost snovi od laboratorijskega.



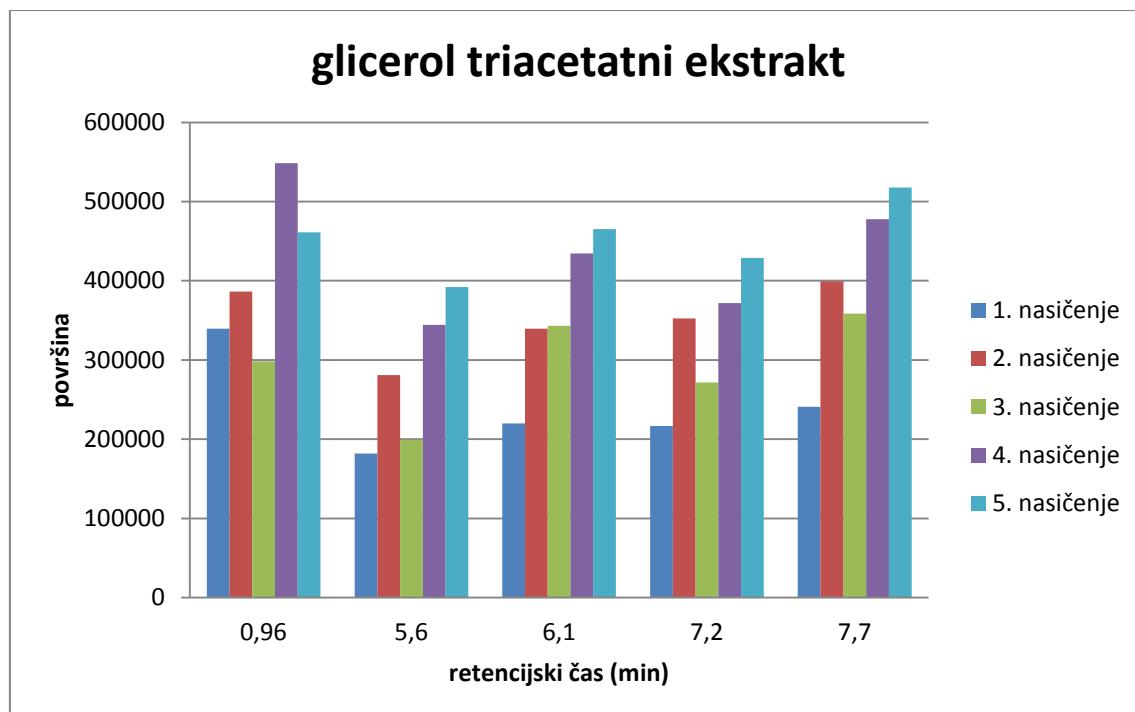
Slika 20: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za PEG ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo.

Površina vrhov pri 85 % glicerolu je naraščala po pričakovanju (Slika 21). Glede na površine pod vrhovi kromatogramov bi lahko zmotno sklepali, da glicerol lažje raztaplja antioksidante kot PEG 400, saj so pri glicerolnem ekstraktu površine pod vrhovi višje kot pri PEG ekstraktu (Slika 20), vendar ne smemo zanemariti volumnov ekstraktov. Volumen glicerolnega ekstrakta po 5. nasičenju je bil 4-krat manjši kot pri PEG ekstraktu in posledično so bili antioksidanti v glicerolnem ekstraktu bolj koncentrirani.



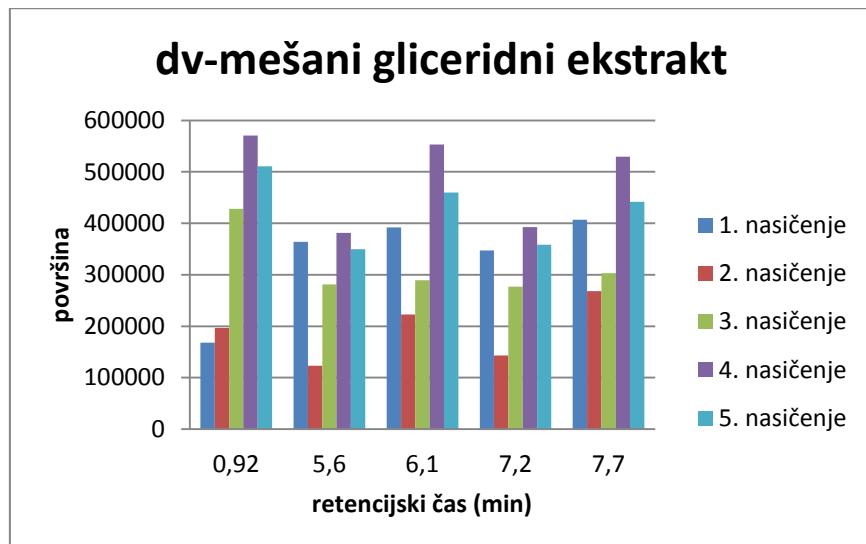
Slika 21: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za 85 % glicerolni ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo.

Površine vrhov pri glicerol triacetatu niso sorazmerno naraščale. (Slika 22).



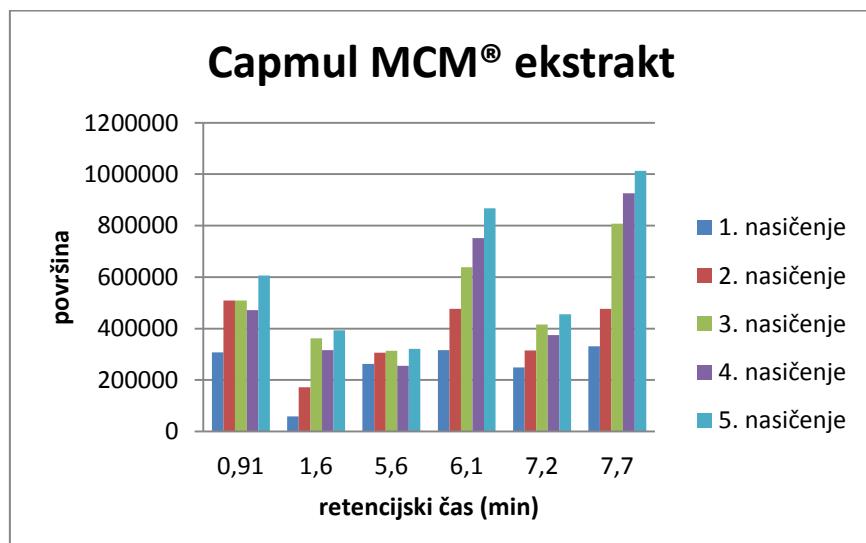
Slika 22: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za glicerol triacetatni ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo.

Površine vrhov pri dv mešanih gliceridih niso naraščale po pričakovanjih (Slika 23). Neenakomerna rast je lahko posledica slabe topnosti spojin, nepopolno odstranjenega etilacetata in posledično povečanega volumna zmesi, ki je razredčil antioksidante ali težavnega pipetiranja zaradi visoke viskoznosti vzorca. Glede na koncentracijsko sestavo je podoben glicerol triacetatnemu ekstraktu (Slika 22).



Slika 23: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za dv mešani gliceridni ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo.

Capmul MCM® ekstrakt je izkazoval trend naraščanja površin vrhov (Slika 24). Pri retencijskem času 7,7 min je imel ekstrakt najvišje površine vrhov, kar je bilo značilno tudi za standardni PEG ekstrakt.

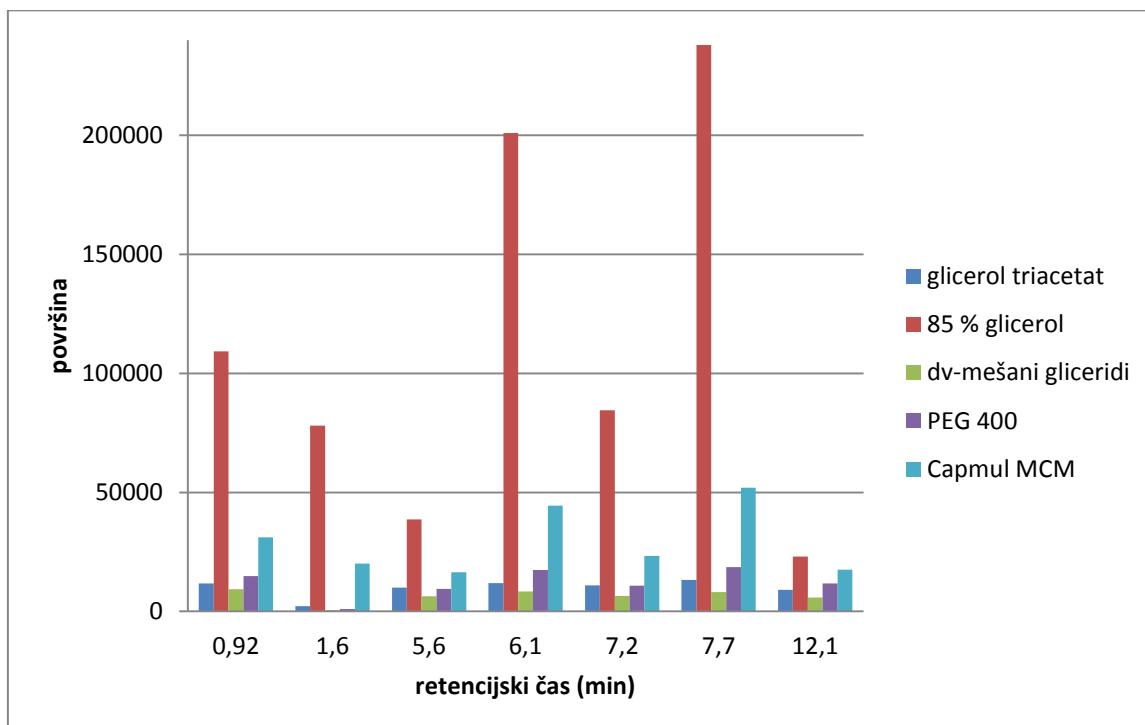


Slika 24: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za Capmul MCM® ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo.

Vsi ekstrakti so imeli podobno sestavo, vendar so bile spojine v njih v različnih koncentracijah. PEG-ov in glicerolni ekstrakt sta si bila tudi po koncentracijski sestavi najbolj podobna. Enako je veljalo za glicerol triacetatni, dv mešani gliceridni in Capmulni MCM® ekstrakt.

Peto nasičenje topil medsebojno ne moremo primerjati, saj so bili volumni končnih ekstraktov različni. Na Sliki 25 smo površine pod krivuljami kromatografskih vrhov preračunali na isti volumen. 85 % glicerol je prejel največjo vsebnost snovi, sledi mu Capmulni MCM®, PEG-ov in glicerol triacetatni ekstrakt, najnižjo vsebnost pa je imel dv mešani gliceridni ekstrakt.

Zaradi omenjenih težav smo v naslednji stopnji izboljšali postopek.

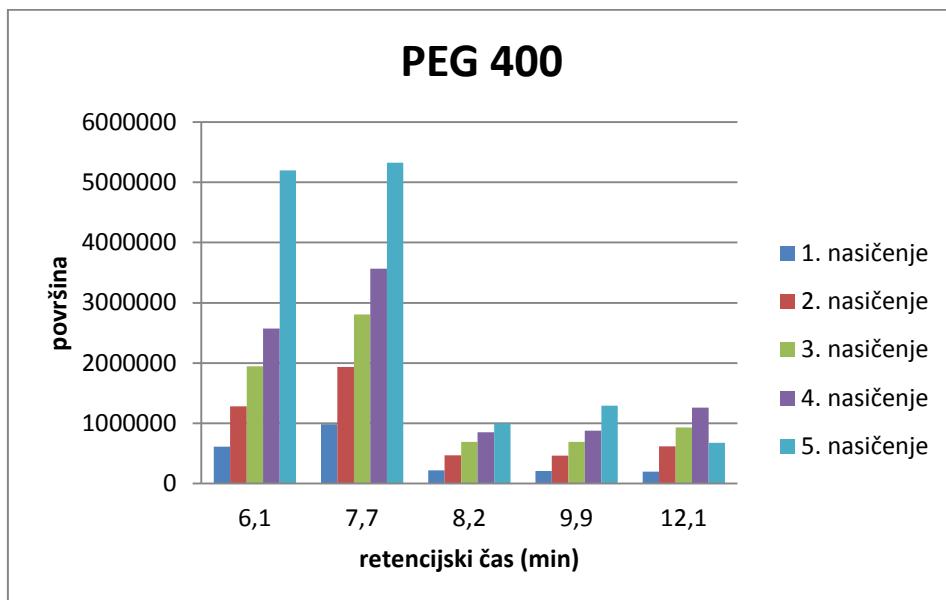


Slika 25: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za topila pri petem nasičenju, preračunana na isti volumen ekstrakta.

#### Rezultati druge priprave vzorcev, kjer smo fazi ločili s pomočjo centrifugiranja

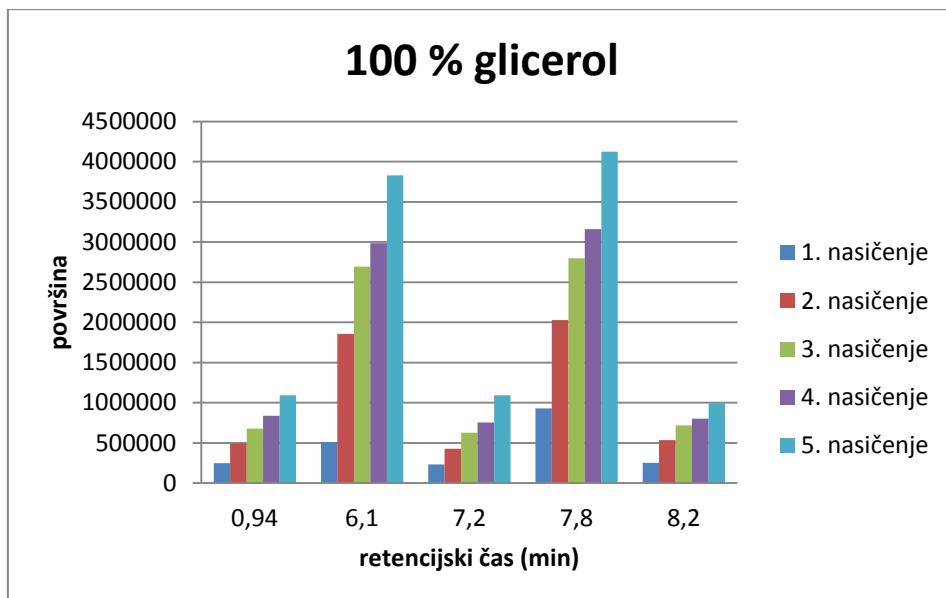
Pri ponovni ekstrakciji je etilacetat vseboval manj vode, saj smo emulgirano vodo odstranili s pomočjo centrifugiranja. Možne napake pri nenatančnem pipetiranju vzorca smo odpravili s tehtanjem. Pri posameznem vzorcu smo etilacetatne ostanke vsakič odparili do konca, torej do začetnega volumna dodanega topila.

Površine vrhov pri PEG ekstraktu so naraščale, kar je v skladu z večkratnim nasičenjem (Slika 26). Pri standardnem PEG ekstraktu (Slika 19) so bile površine višje kot pri PEG ekstraktu, ki smo ga pripravili sami.



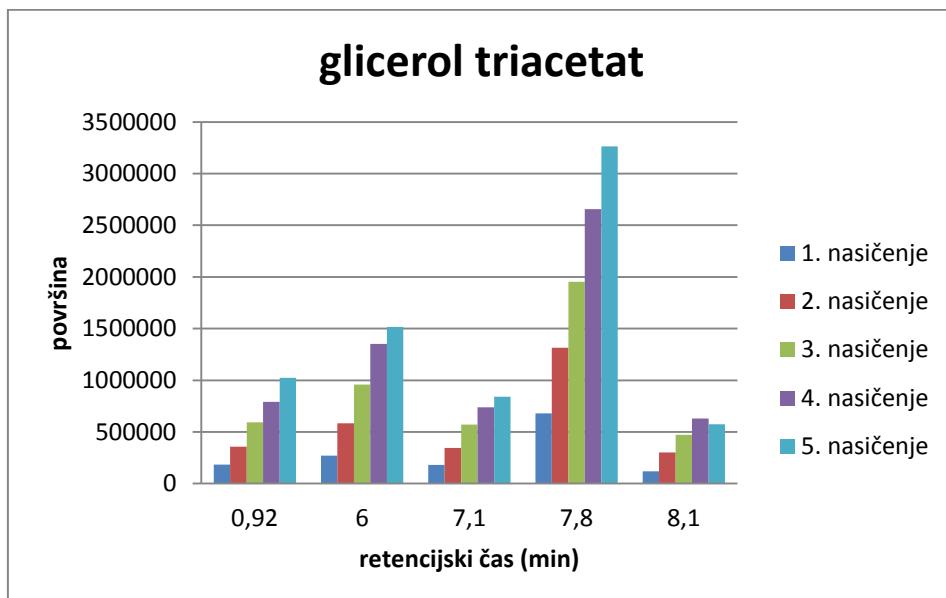
Slika 26: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za PEG 400 ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo.

Površine vrhov pri glicerolnem ekstraktu so naraščale glede na večkratno nasičenje z etilacetatno fazo (Slika 27). Namesto 85 % glicerola, ki smo ga uporabili v prvi ekstrakciji, smo v tem primeru uporabili 100 % glicerol, da bi izničili vpliv prisotne vode.



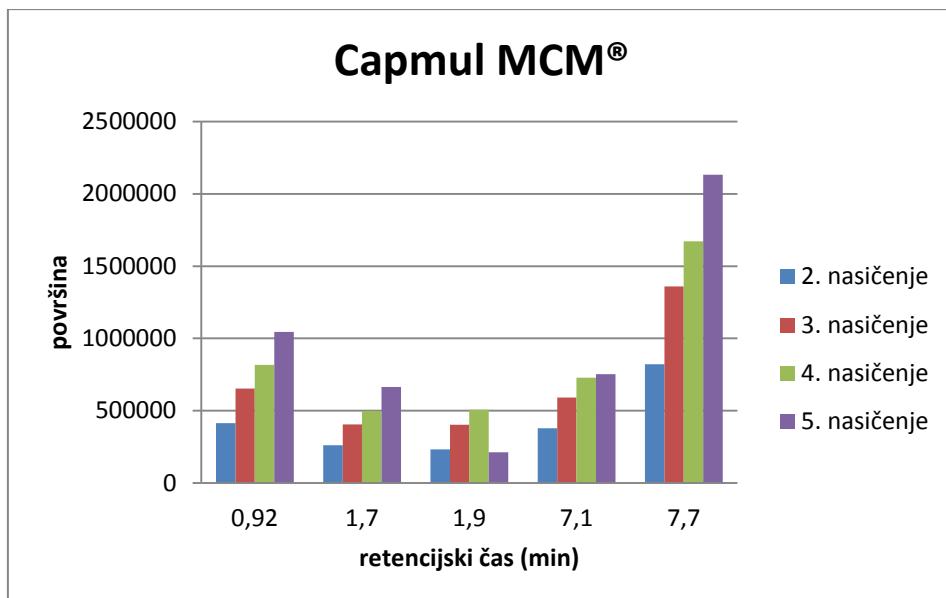
Slika 27: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za 100 % glicerolni ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo.

Površine vrhov glicerol triacetatnega ekstrakta so naraščale glede na nasičenje z etilacetatno fazo (Slika 28). Površine so bili manjše v primerjavi z PEG-ovim in glicerolnim ekstraktom.



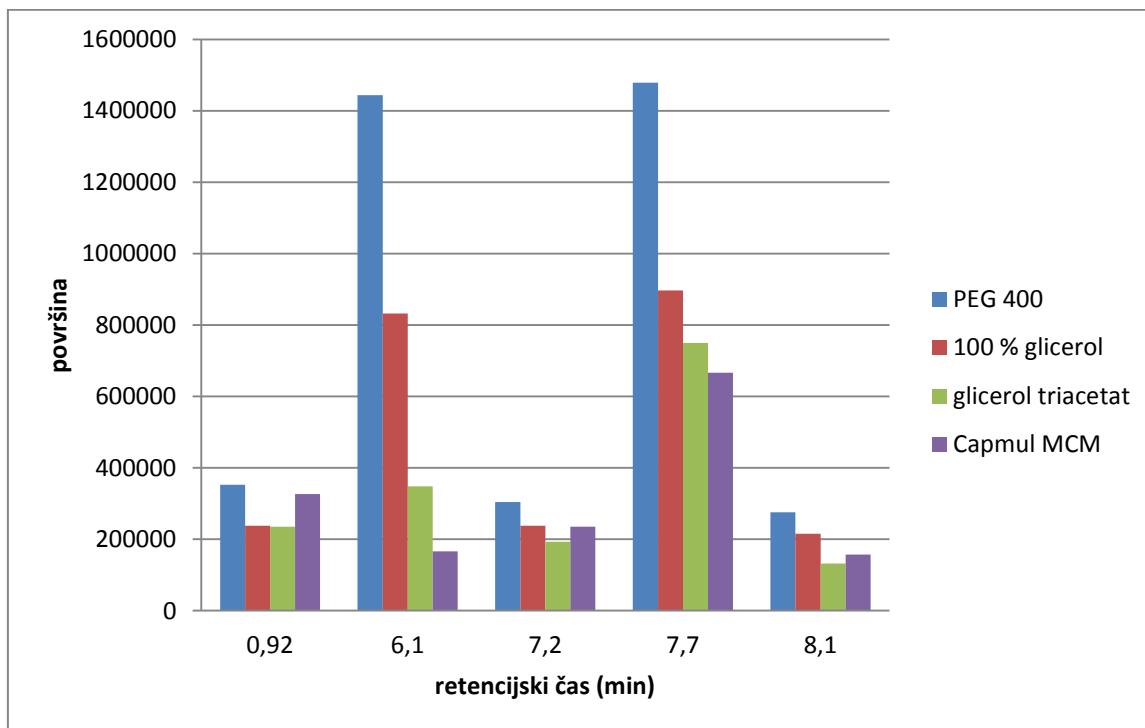
Slika 28: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za glicerol triacetatni ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo.

Površine vrhov Capmulnega MCM® ekstrakta naraščajo glede na nasičenje z etilacetatno fazo (Slika 29). Vzorca prvega nasičenja z etilacetatno fazo nismo analizirali s HPLC, saj je nastala oborina.



Slika 29: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za Capmul MCM® ekstrakt pri postopnem nasičevanju z etilacetatno fazo.

Na Sliki 30 smo površine pod krivuljami kromatografskih vrhov preračunali na isti volumen. PEG 400 je prejel največjo vsebnost snovi, sledijo mu 100 % glicerol, Capmul MCM® in glicerol triacetatni ekstrakt.



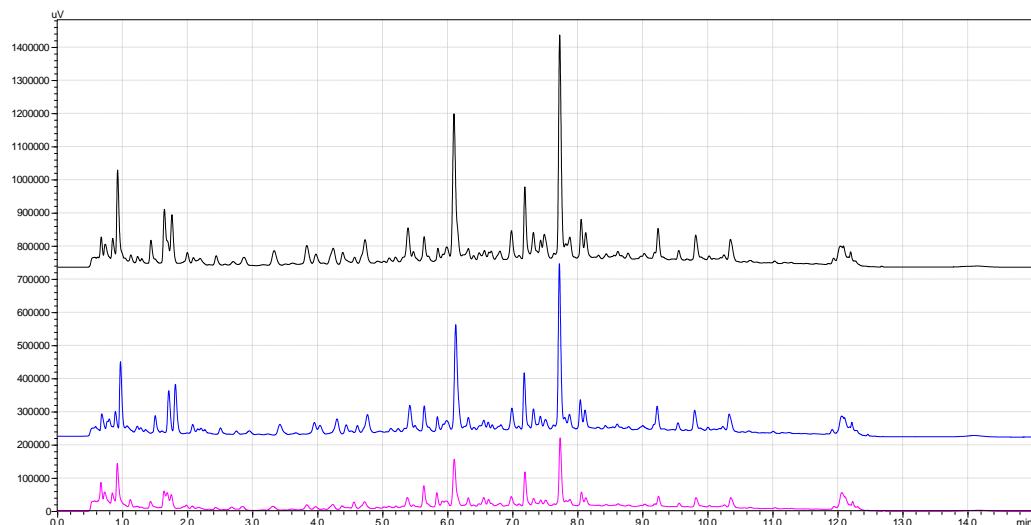
Slika 30: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za topila pri petem nasičenju, preračunana na isti volumen ekstrakta.

Druga ekstrakcija, kjer so fazi ločili s centrifugiranjem predstavlja bolj realno stanje kot prva ekstrakcija, kjer smo fazi ločili z lij ločnikom zaradi odstranjene emulgirane vode in etilacetata ter izboljšanega odmerjanja vzorcev. Kromatogrami so si med različnimi topili podobni. Ekstrakta dv mešanih gliceridov nismo analizirali, ker je z vodo za pripravo HPLC vzorca tvoril nemešajočo plast. Prav tako smo imeli težave pri raztopljanju glicerol triacetatnega in Capmulnega MCM® ekstrakta, ki sta z vodo tvorila oborino, zato smo za analizo uporabili le supernatant.

Standardni PEG ekstrakt je imel najvišje površine vrhov. Sledili so mu PEG-ov ekstrakt, temu pa glicerolni in glicerolni triacetatni. Najnižje vrhove je imel Capmulni MCM® ekstrakt.

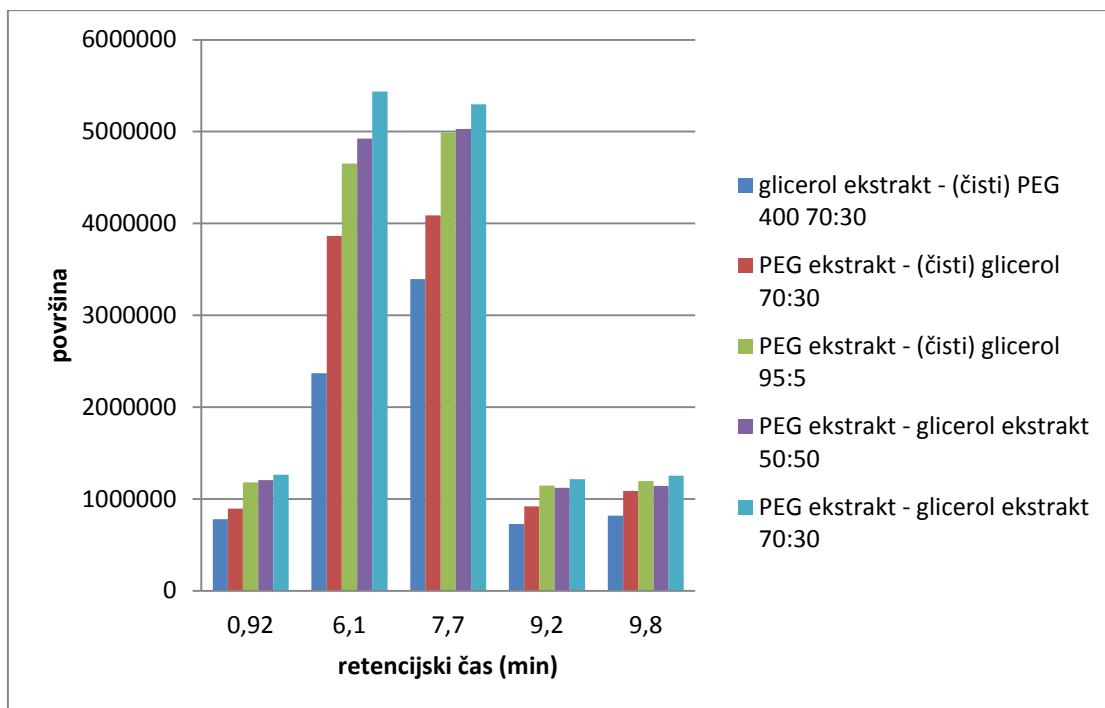
### Redčenje PEG ekstrakta

Zaradi odvajjalnega učinka PEG smo razvili idejo, da bi lahko pripravili farmacevtsko obliko, v kateri bi imeli mešanico PEG in glicerolnega ekstrakta v razmerju 1:1. Posneli smo kromatogram prej navedene mešanice (Kromatogram 1). S črno barvo je označen 85 % glicerolni ekstrakt. Z modro barvo smo označili mešanico PEG in glicerolnega ekstrakta v razmerju 1:1. Z vijolično barvo pa PEG ekstrakt. Razvidno je, da so se vrhovi ujemali.



Kromatogram 1: Črno - glicerolni ekstrakt, modro - mešanica PEG in glicerolnega ekstrakta ter vijolična - PEG ekstrakt.

Nadaljevali smo z analizo mešanic glicerolnega ekstrakta in čistega PEG 400 v razmerju 70:30, PEG ekstrakta in čistega glicerola v razmerju 70:30 ter v razmerju 95:5 in PEG ekstrakta z glicerolnem ekstraktom v razmerju 50:50 ter v razmerju 70:30 (Slika 31). Ugotovili smo, da spojine iz PEG ekstrakta in glicerolnega ekstrakta medsebojno ne reagirajo, saj ni bilo opaznih novih vrhov in bi bil glicerol primeren za redčenje PEG ekstrakta.



Slika 31: Prikaz površin vrhov pri retencijskih časih (min) za mešanice ekstraktov s čistimi topili in ekstraktov z ekstrakti.

Raztpljanje PEG ekstrakta smo preizkusili še pri ostalih topilih. Opazovali smo raztpljanje in kontrakcijo volumna.

Dv mešani gliceridi se ne mešajo s standardnim PEG ekstraktom in so neprimerni za redčenje ekstrakta (Slika 32). Pojavila se je tudi kontrakcija volumna in rahlo segrevanje zmesi (Preglednica IV).

Preglednica IV: Lastnosti pri mešanju PEG ekstrakta z dv mešanimi gliceridi.

V (standardni PEG ekstrakt) (mL)	V (dv mešani gliceridi) (mL)	V(celotni) (mL)	Kontrakcija (mL)	Opis
7,5	2,5	9,25	0,75	razplastitev - ekstrakt na dnu
5	5	9	1	razplastitev - ekstrakt na dnu



Slika 32: Redčenje PEG ekstrakta z dv mešanimi gliceridi.

Glicerol triacetat je primeren za redčenje standardnega PEG ekstrakta, vendar le do razmerja 1:1. Pri zmesi, ki vsebuje 75 % glicerol triacetata lipofilnost močno naraste in fenoli v ekstraktu niso več topni (Slika 33). Prav tako je tudi v tem primeru prisotna kontrakcija volumna, kar prikazuje Preglednica V.

Preglednica V: Lastnosti pri mešanju PEG ekstrakta z glicerol triacetatom.

V (standardni PEG ekstrakt) (mL)	V (glicerol triacetat) (mL)	V(celotni) (mL)	Kontrakcija (mL)	Opis
7,5	2,5	9,5	0,5	raztopina
5	5	9,75	0,25	raztopina
2,5	7,5	9,75	0,25	razplastitev - ekstrakt na dnu



Slika 33: Redčenje PEG ekstrakta z glicerol triacetatom.

Glicerol se zaradi svoje hidrofilnosti delno meša z standardnim PEG ekstraktom. Pri pripravi zmesi smo opazili gradient, zaradi katerega ni primeren za redčenje ekstrakta (Slika 34). Prisotna je tudi kontrakcija volumna (Preglednica VI).

Preglednica VI: Lastnosti pri mešanju PEG ekstrakta z glicerolom.

V (standardni PEG ekstrakt) (mL)	V (100 % glicerol) (mL)	V(celotni) (mL)	Kontrakcija (mL)	Opis
7,5	2,5	9	1	gradient
5	5	9,25	0,75	gradient
2,5	7,5	9	1	gradient



Slika 34: Redčenje PEG ekstrakta z glicerolom.

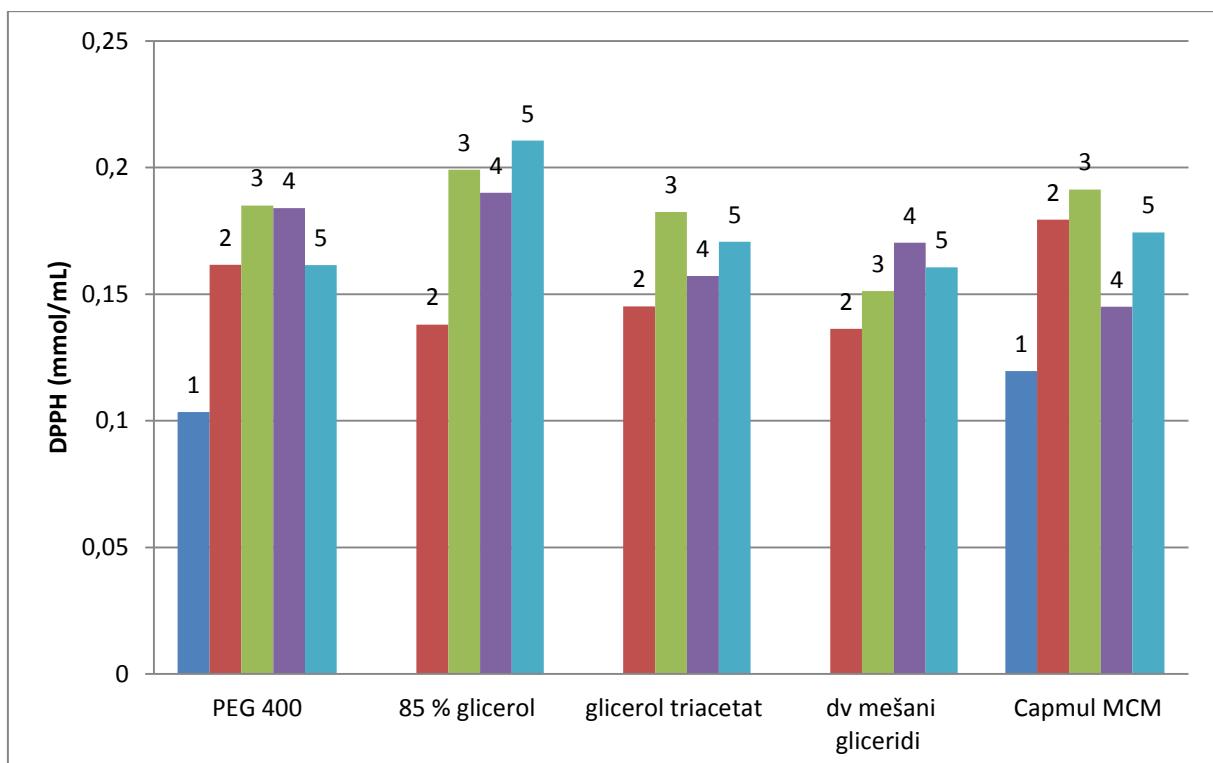
Oljčno olje se zaradi svoje lipofilnosti ne meša s standardnim PEG ekstraktom in je neuporabno za redčenje ekstrakta (Preglednica VII).

Preglednica VII: Lastnosti pri mešanju PEG ekstrakta z oljčnim oljem.

V (standardni PEG ekstrakt) (mL)	V (oljčnega olja) (mL)	V(celotni) (mL)	Kontrakcija (mL)	Opis
7,5	2,5	9,25	0,75	razplastitev - ekstrakt na dnu
5	5	9,5	0,5	razplastitev - ekstrakt na dnu
2,5	7,5	9,75	0,25	razplastitev - ekstrakt na dnu

### 5.3 DPPH metoda

S postopnim nasičevanjem topila z etilacetatno fazo smo pričakovali porast AOP. AOP je predstavljen s stolpčnim diagramom, kjer se na osi y nahaja AOP. Na vrhu stolpca je pripisano zaporedno nasičenje z etilacetatno fazo. Takšnih rezultatov vzorcev, pridobljenih s prvo ekstrakcijo (Slika 35) nismo pričakovali.



Slika 35: AOP vsakega topila in nasičenja za prvo ekstrakcijo, kjer smo fazi ločili z lij ločnikom.

Vzrok za nihanje AOP je lahko, podobno kot pri HPLC analizah, nenatančno odmerjanje vzorca ali prehitro zaključeno odstranjevanje topila pod znižanim tlakom, zaradi česar je volumen vzorca predvsem na račun vode večji in so antioksidanti manj koncentrirani. Pri opazovanju petega nasičenja ima ekstrakt dv mešanih gliceridov najslabši AOP, kar je lahko vpliv slabega raztopljanja antioksidantov v topilu ali redčenja antioksidantov zaradi velikega volumna ekstrakta, ki je bil tu najvišji. Glicerolni ekstrakt, ki ima po petem nasičenju najvišji AOP ima po drugi strani najnižji volumen ekstrakta.

Pri drugi, izboljšani ekstrakciji smo topilom dodajali centrifugirano etilacetatno fazo, z odstranjeno emulgirano vode. Nenatančno odmerjanje volumnov vzorcev smo rešili s tehtanjem. Rezultati AOP po petem nasičenju so predstavljeni v Preglednici VIII. Ekstrakt s Capmul MCM® ima najslabši antioksidativni potencial, kar smo opazili tudi pri HPLC kromatogramih, kjer je imel najnižje površine vrhov. Najboljše topilo za raztopljanje antioksidantov so glede na DPPH analizo dv mešani gliceridi, vendar jih zaradi netopnosti v mobilni fazi nismo analizirali s HPLC analizo.

Preglednica VIII: DPPH rezultati druge ekstrakcije, kjer smo fazi ločili s pomočjo centrifugiranja.

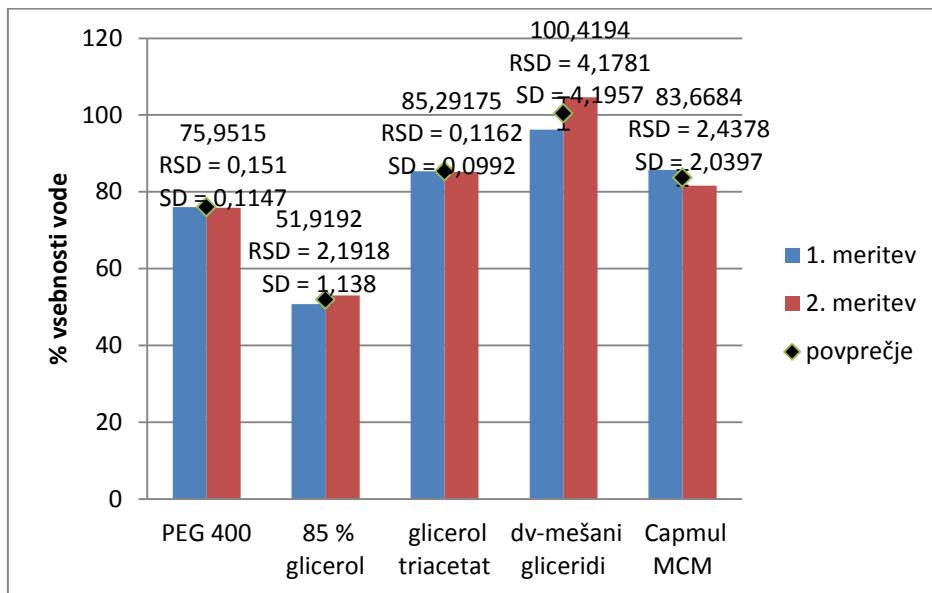
Topilo	AOP (mmol/g)
Capmul MCM®	0,1821
Glicerol 100 %	0,2022
Glicerol triacetat	0,2047
PEG 400	0,2492
Dv mešani gliceridi	0,2616

Vsi ekstrakti so antioksidativno slabše učinkoviti kot standardni PEG izvleček, ki ima AOP 0,7569 mmol/g.

## 5.4 Ugotavljanje vode v ekstraktih s Karl Fischer-jevo metodo

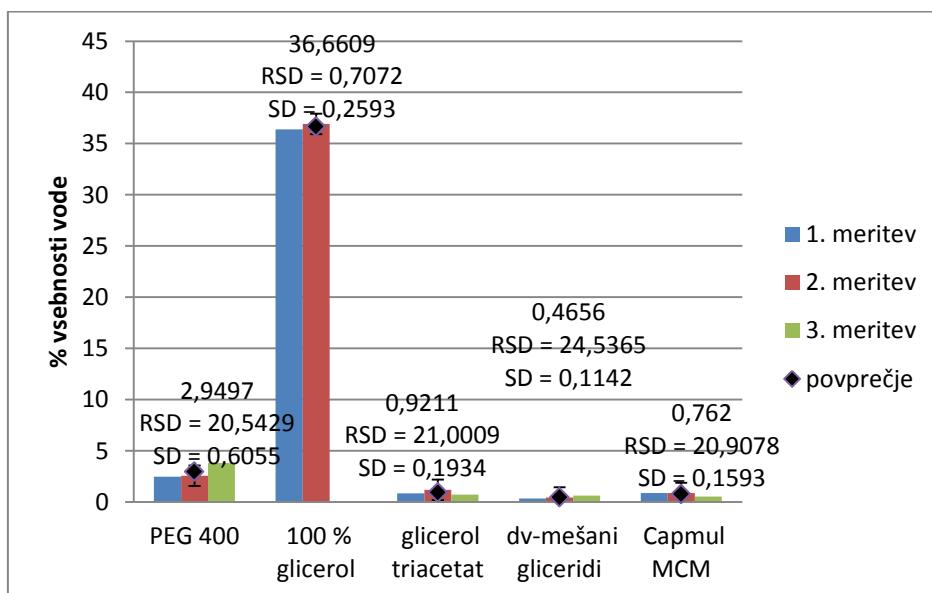
Pri ugotavljanju vsebnosti vode v vzorcih iz prve ekstrakcije, kjer smo fazi ločili z lij ločnikom smo se soočili z obarjanjem komponent ekstrakta v kivetih ob dodajanju Hydralal® titranta, zato smo meritve ponovili z redčenjem vzorcev z metanolom, kar smo upoštevali pri končnih izračunih. Izmerjene vsebnosti vode (Slika 36) so zelo visoke in se

ujemajo z volumni končnih ekstraktov, ki so predstavljeni v Preglednici II in so tako visoki predvsem na račun neodstranjene vode.



Slika 36: Vsebnost vode (%) v ekstraktih pri prvi ekstrakciji, kjer smo fazi ločili z lij ločnikom.

Pri drugi ekstrakciji, kjer smo fazi ločili s pomočjo centrifugiranja je bila vsebnost vode manjša kot pri prvi, saj smo s centrifugiranjem odstranili emulgirano vodo iz ekstrakta (Slika 37). Vsebnost vode smo lahko določali direktno iz vzorcev. Le glicerolni ekstrakt je bilo zaradi velike vsebnosti vode potrebno redčiti z metanolom v razmerju 1:9. Glicerolni ekstrakt je zaradi higroskopnosti glicerola vseboval več vode, kar je bilo razvidno tudi iz višjega volumna ekstrakta, kar je razvidno iz Preglednice III.

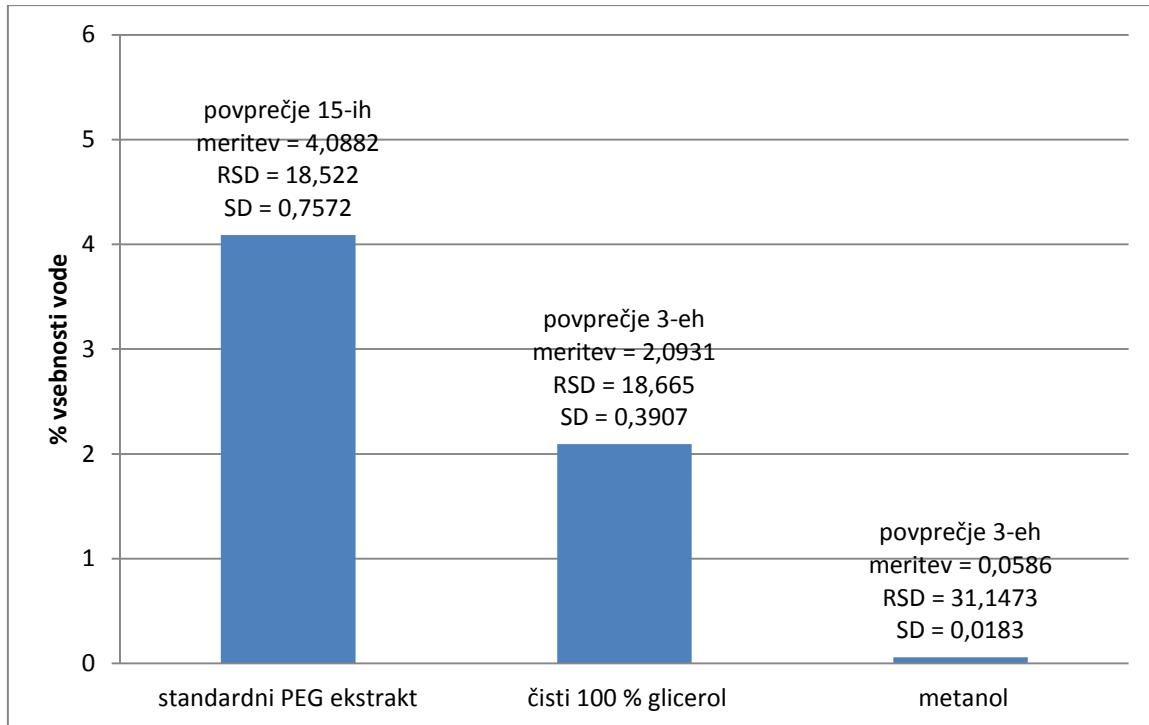


Slika 37: Vsebnost vode (%) v ekstraktih pri drugi ekstrakciji, kjer smo fazi ločili s pomočjo centrifugiranja.

Čisti glicerol ima nizko vsebnost vode (Preglednica IX in Slika 38), medtem ko ima glicerolni ekstrakt visoko. Zaradi treh hidroksilnih skupin v svoji strukturi močneje veže vodo kot ostala topila in jo je tako težje odstraniti. Z analizo čistega glicerola smo ovrgli možno interakcijo Karl Fischer-jevih reagentov s hidroksilnimi skupinami. Standardni PEG ekstrakt (Preglednica IX in Slika 38) in laboratorijsko pridobljen PEG ekstrakt imata primerljivo vlogo.

Preglednica IX: Vsebnost vode v standardnem PEG ekstraktu.

Število meritev vlage (%)	Standardni PEG ekstrakt	Čisti 100 % glicerol	Metanol
1	5,0195	1,8193	0,08
2	2,8686	1,8144	0,0604
3	2,7843	2,6456	0,0354
4	4,5725	/	/
5	4,1521	/	/
6	4,1033	/	/
7	5,3065	/	/
8	4,6833	/	/
9	4,451	/	/
10	4,4136	/	/
11	4,4429	/	/
12	4,4179	/	/
13	2,828	/	/
14	3,5842	/	/
15	3,6953	/	/
Povprečje	4,0882	2,0931	0,0586
Relativna standardna deviacija	18,522	18,665	31,1473
Standardna deviacija	0,7572	0,3907	0,0183



Slika 38: Vsebnost vode (%) pri standardnem PEG ekstraktu, čistem glicerolu in metanolu.

Velika odstopanja med meritvami so bila posledica nenatančne ugotovitve ekvivalentne točke Hydranal® topila, ki smo jo v tem primeru določali vizualno. Metodo smo v nadaljevanju izboljšali.

## 5.5 Validacija Karl Fischer-jeve metode

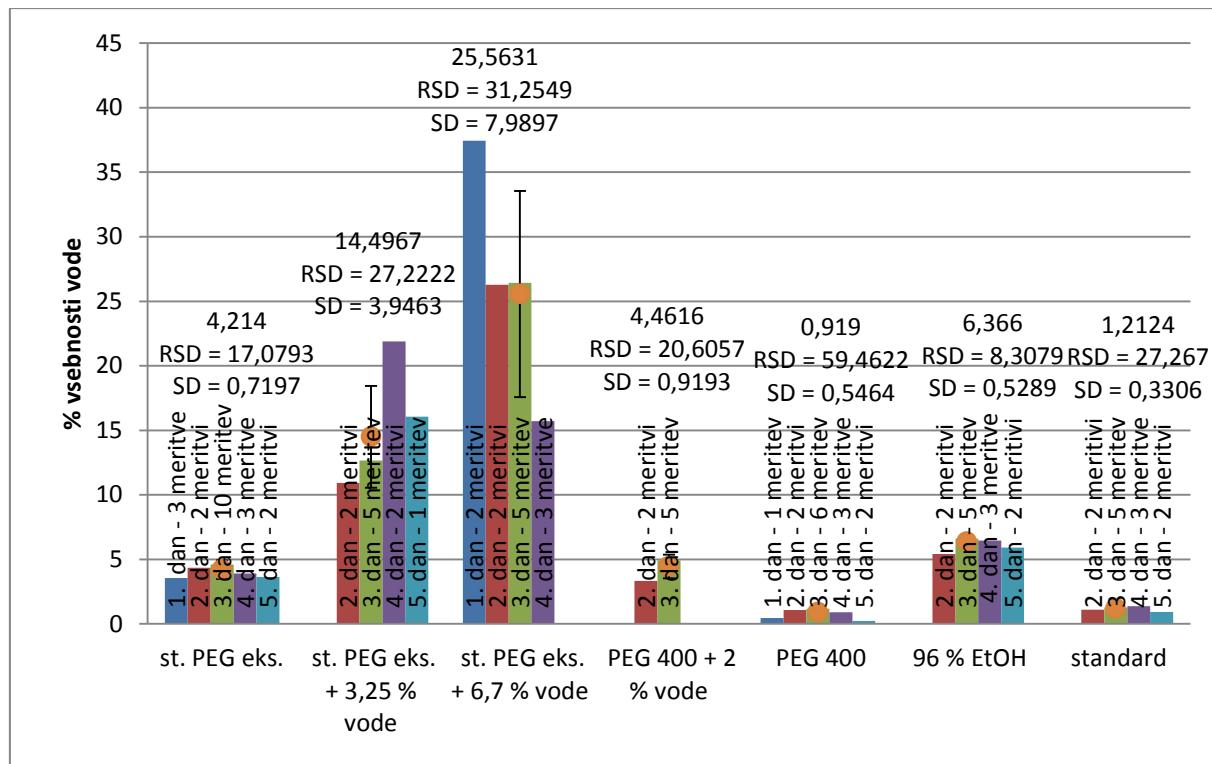
Novo uvedeno metodo zaznavanja ekvivalentne točke s spektrofotometrom smo validirali.

Preverili smo dnevno in meddnevno ponovljivost ter natančnost in točnost analize.

PEG 400, 96 % etanolu in Hydranal® standardu smo izmerili vodo tudi z referenčno Hydranal® metodo in s tem preverili točnost modificirane metode.

Preglednica X: Določitev vode v standardnem (stan.) PEG ekstraktu in z dodatki vode, PEG 400 topilu in z dodatki vode, 96 % EtOH in standardu.

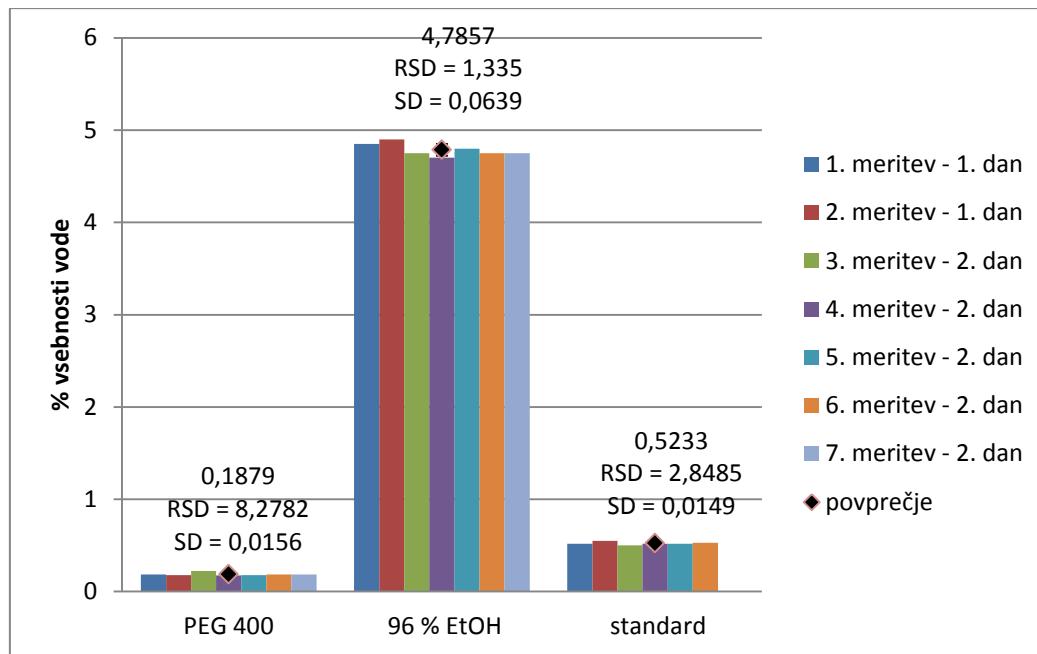
Št. analize	Dan	Stan. PEG ekstrakt	Stan. PEG ekstrakt + 3,25 % H <sub>2</sub> O	Stan. PEG ekstrakt + 6,7 % H <sub>2</sub> O	PEG 400 + 2 % H <sub>2</sub> O	PEG 400	96 % EtOH	Standard
1	1	5,0195	/	37,5422	/	0,449	/	/
2	1	2,8686	/	37,3563	/	/	/	/
3	1	2,7843	/	/	/	/	/	/
4	2	4,5725	10,878	25,2749	3,3994	0,6586	5,4086	1,2636
5	2	4,1521	10,9476	27,2563	3,2516	1,4894	6,683	0,9618
6	3	4,1033	12,8731	28,6256	4,5055	1,7185	6,5096	1,1863
7	3	5,3065	11,8079	21,2319	4,7517	0,8571	6,61	0,9091
8	3	4,6833	12,5598	20,8065	4,2299	0,317	6,8005	1,3398
9	3	4,451	13,1837	34,0196	6,1907	2,0286	5,9897	1,9309
10	3	4,4136	12,8745	27,484	4,9026	1,4299	7,1774	1,0198
11	3	4,1033	/	/	/	0,773	/	/
12	3	5,3065	/	/	/	/	/	/
13	3	4,6833	/	/	/	/	/	/
14	3	4,451	/	/	/	/	/	/
15	3	4,4136	/	/	/	/	/	/
16	4	4,4429	22,2407	9,196	/	1,0422	6,3775	1,7255
17	4	4,4179	21,544	18,8744	/	0,8052	5,8548	1,457
18	4	2,828	/	19,0892	/	0,8335	7,1401	0,9132
19	5	3,5842	16,0575	/	/	0,0487	6,0006	0,9488
20	5	3,6953	/	/	/	0,4147	5,8403	0,8934
Povprečje		4,214	14,4967	25,5631	4,4616	0,919	6,366	1,2124
Relativna standardna deviacija		17,0793	27,2222	31,2549	20,6057	59,4622	8,3079	27,267
Standardna deviacija		0,7197	3,9463	7,9897	0,9193	0,5464	0,5289	0,3306



Slika 39: Vsebnost vode (%) v standardnem PEG ekstraktu in z dodatki vode, PEG 400 topilu in z dodatki vode, 96 % EtOH in standardu.

Preglednica XI: Določitev vode PEG 400, 96 % EtOH in standardu z referenčno Hydralal® metodo

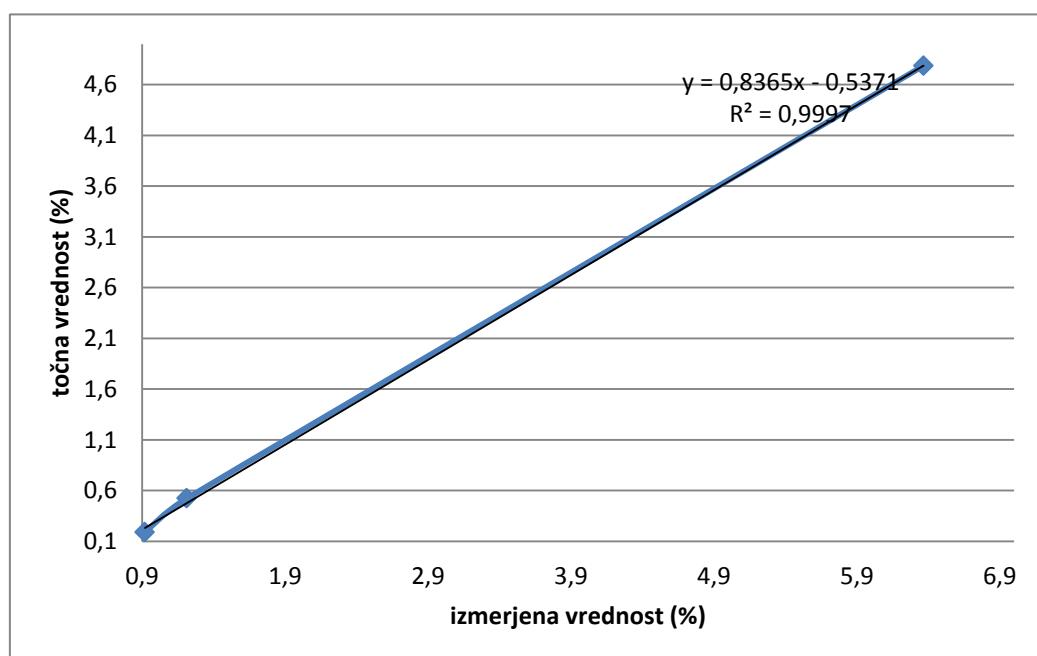
Številka analize	Dan	PEG 400	96 % EtOH	Standard
1	1	0,185	4,85	0,52
2	1	0,18	4,9	0,55
3	2	0,225	4,75	0,5
4	2	0,175	4,7	0,52
5	2	0,18	4,8	0,52
6	2	0,185	4,75	0,53
7	2	0,185	4,75	/
Povprečje		0,1879	4,7857	0,5233
Relativna standardna deviacija		8,2782	1,335	2,8485
Standardna deviacija		0,0156	0,06389	0,0149



Slika 40: Vsebnost vode (%) pri PEG 400, 96 % EtOH in standardu določeno z referenčno Hydralan® metodo.

Preglednica XII: Primerjava spektrofotometričnih rezultatov s točnimi vrednostmi vode v vzorcu.

Številka analize	Vzorec	Vsebnost vode (%) določena s spektrofotometrom	Točna vrednost	Absolutna napaka
1.	PEG 400	0,919	0,1879	0,7311
2.	96 % EtOH	6,366	4,7857	1,5803
3.	Hydralan® standard	1,2124	0,5233	0,6891



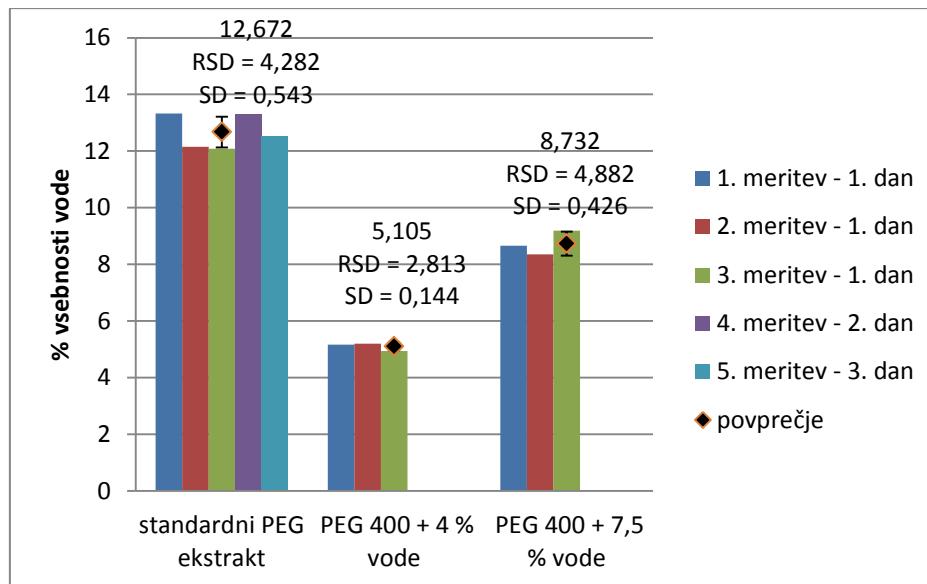
Graf 3: Prikaz linearnosti spektrofotometričnih določitev vsebnosti vode glede na točne vrednosti.

Ponovljivost novo uvedene metode smo testirali z večkratnim dnevnim in meddnevnim merjenjem vsebnosti vode v različnih vzorcih (Preglednica X in Slika 39). S primerjavo rezultatov vzorcev, merjenih z referenčno Hydranal® metodo (točna vrednost) smo ugotovili, da z novo metodo določimo višjo vsebnost vode, kot je v resnici prisotna. Rezultati absolutnih napak so predstavljeni v Preglednici XII in Grafu 3. Rezultati validacije niso bili zadovoljivi.

Vizualna določitev konca nevtralizacije Hydranal® topila je manj natančna kot spektrofotometrična, saj človeško oko nima tako nizke meje detekcije kot spektrofotometer, zato smo metodo v nadaljevanju modificirali. Dodatna modifikacija metode, kjer smo za nevtralizacijo Hydranal® topila uporabili spektrofotometer, se je izkazala za bolj ponovljivo in točno metodo kot metoda, kjer smo uporabili vizualno določanje. Ponovljivost modificirane Karl Fischer-jeve metode smo preverjali s petkratnim merjenjem standardnega PEG ekstrakta in trikratnim merjenjem PEG 400. Meritve standardnega PEG ekstrakta smo izvajali v treh dneh in s tem preverili meddnevno ponovljivost metode (Preglednica XII in Slika 41). Točnost in linearnost smo dokazali s šestimi vzorci, ki vsebujejo različen procent vode in jih primerjali z ocenjenimi vrednostmi (Preglednica XIV). Absolutne napake so nižje kot pri metodi, kjer smo nevtralizacijo Hydranal® topila zaznavali vizualno. Hydranal® standard ima navedeno vsebnost vlage 0,5 %, vendar smo z referenčno metodo ugotovili 0,523 %. Vzorcem številka 2, 3, 4 in 5 smo dodali znano vsebnost vode (4 ali 7,5 %) in dokazali linearnost (Graf 4). Vzorcu številka 1 (Hydranal® standard) in 6 (PEG 400) smo ugotovili vsebnost vode z referenčno metodo (Preglednica X in Slika 40).

Preglednica XIII: Določitev vode v standardnem PEG ekstraktu in PEG 400 z dodatki vode.

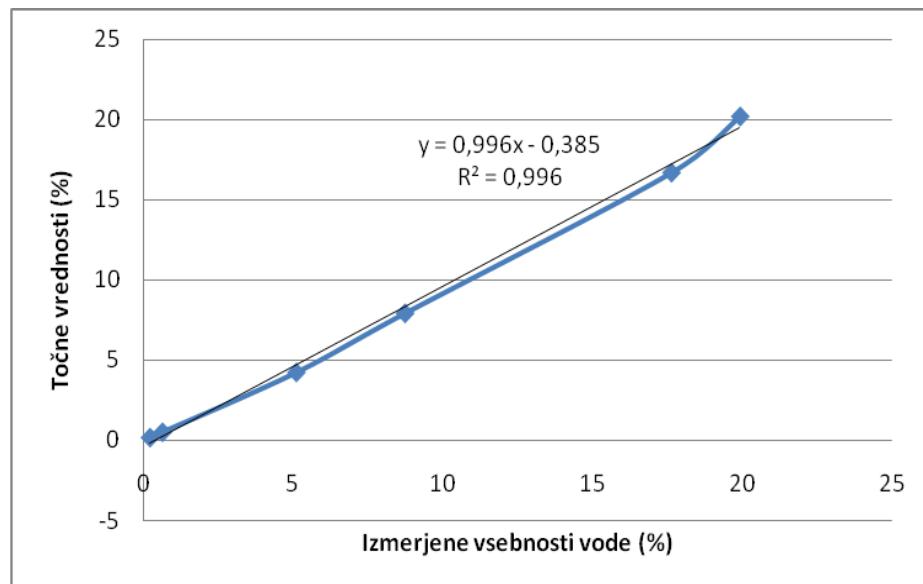
Številka analize	Dan	Standardni PEG ekstrakt	PEG 400 + 4 % H <sub>2</sub> O	PEG 400 + 7,5 % H <sub>2</sub> O
1	1	13,322	5,170	8,655
2	1	12,152	5,204	8,350
3	1	12,079	4,940	9,192
4	2	13,304	/	/
5	3	12,504	/	/
Povprečje		12,672	5,105	8,732
Relativna standardna deviacija		4,282	2,813	4,882
Standardna deviacija		0,543	0,144	0,426



Slika 41: Vsebnost vode (%) v standardnem PEG ekstraktu in PEG 400 z dodatki vode.

Preglednica XIV: Izmerjene in dejanske vsebnosti vode v vzorcih.

Številka vzorca	Vzorec	Izmerjena vsebnost vode (%)	Točne vrednosti	Absolutna napaka
1	HYDRANAL® standard	0,634	0,500 (0,5233)	0,134 (0,1107)
2	Standardi PEG ekstrakt + 7,5 % vode	19,919	20,172	0,253
3	Standardni PEG ekstrakt + 4 % vode	17,627	16,672	0,955
4	PEG 400 + 7,5 % vode	8,732	7,920	0,813
5	PEG 400 + 4 % vode	5,105	4,238	0,867
6	PEG	0,220	0,188	0,032



Graf 4: Prikaz linearnosti spektrofotometričnih določitev vsebnosti vode glede na točne vrednosti.

## 6. Sklep

1. Pri meritvi volumnov ekstraktov smo ugotovili, da glicerol in glicerol triacetat močno vežeta vodo, ki jo težko odstranimo, kljub močnem znižanju tlaka pri odparevanju.
2. HPLC analiza je potrdila, da je za ekstrakcijo antioksidantov najbolj primerno topilo PEG 400. Raztopljanje dobro poteče tudi pri glicerolu, najslabše pa se je obnesel Capmul MCM®.
3. Standardni PEG ekstrakt ima bistveno večji AOP kot laboratorijsko pridobljeni ekstrakti. Najslabši AOP ima Capmul MCM®, najboljšega pa dv mešani gliceridi in PEG 400.
4. Pri Karl Fischer-jevi metodi smo potrdili domnevo iz volumnov ekstraktov, da glicerol in PEG 400 močno vežeta vlago. Glicerol jo veže sicer bistveno močneje kot PEG 400, vendar oba več kot ostala topila.

Novo uvedeno metodo smo validirati glede na točnost, ponovljivost in linearnost.

5. Za redčenje PEG ekstrakta je primeren glicerol triacetat, vendar le do razmerja 1:1. Ostala testirana topila so neprimerna, ker ne raztopljamajo vseh komponent ekstrakta.

## 7. Literatura

- 1) Pfaff R., Merkh G., Isengard H. D.: Capabilities of automated Karl-Fischer-titration of selected dairy products, University of Hohenheim, Institute of Food Science and Biotechnology, Stuttgart, Germany.
- 2) Yazgan S., Bernreuther A., Ulberth F., Isengard H. D.: Water – an important parameter for the preparation and proper use of certified reference materials, Food Chemistry, 2006, vol. 96, no. 3, 411-417.
- 3) De Caro C. A., Aichert A., Walter C. M.: Efficient, precise and fast water determination by the Karl Fischer titration, Food Control, 2001, vol. 12, no. 7, 431-436.
- 4) Morgano M. A., Milani R. F., Martins M. C. T., Rodriguez-Amaya B.: Determination of water content in Brazilian honeybee-collected pollen by Karl Fischer titration, Food Control, 2011, vol. 22, no. 10, 1604-1608.
- 5) Tavčar E., Turk E., Kreft S.: Simple modification of Karl-Fischer titration method for determination of water content in colored samples, Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2012.
- 6) Hach lange d.o.o., Radiometer analytical, Karl Fischer Volumetric Titration Theory and Practice, DOC182.52.20102.Jun09.
- 7) Gorenc D., Čuk M., Kosta L., Strlič M.: Vaje iz analizne kemije kvantitativni del (za univerzitetni študijski program kermije), gradivo za vaje, Ljubljana, september 2001, 65-69.
- 8) Skoog D. A., West D. M., Holler F. J.: Fundamentals of analytical chemistry, seventh edition, 1996, 381-383.
- 9) Schöffski K.: New Karl Fischer reagents for the water determination in food, Food Control, 2001, vol. 12, no. 7, 427-429.
- 10) Kralj P., Kralj Cigić I., Pompe M., Guček M., Levart A., Keber I., Veber M.: Analizna kemija, navodila za laboratorijske vaje (univerzitetni študijski program farmacije), Ljubljana 2006, 74-75.
- 11) Bruttel P., Schlink R.: Water Determination by Karl Fischer Titration, Metrohm, 2006.

- 
- 12) Larsson W., Panitz J. C., Cedergren A.: Interference-free coulometric titration of water in lithium bis (oxalato) borate using Karl Fischer reagents based on N-methylformamide, *Talanta*, 2006, vol. 69, no. 1, 276-280.
- 13) <http://products.metrohm.com/products/titration/cat-karl-fischer-titrator.aspx?ctgyName=pgTitration-Karl-Fischer> Datum dostopa: 15. november 2011
- 14) Alič B.: Biampometrična titracija, Določitev vode po Karl-Fischer postopku, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2010.
- 15)  
[http://www.ffcr.or.jp/zaidan/ffcrhome.nsf/7bd44c20b0dc562649256502001b65e9/146fd852cd5e269049256f32001a133e/\\$file/b43.pdf](http://www.ffcr.or.jp/zaidan/ffcrhome.nsf/7bd44c20b0dc562649256502001b65e9/146fd852cd5e269049256f32001a133e/$file/b43.pdf) Datum dostopa: 15. november 2011
- 16) Felgner A., Schlink R., Kirschenbühler P., Faas B., Isengard H. D.: Automated Karl Fischer titration for liquid samples – water determination in edible oils, *Food Chemistry*, 2008, vol. 106, no. 4, 1379-1384.
- 17) Dominguez V. C., McDonald C. R., Johnson M.: The characterization of a custom-built coulometric Karl Fischer titration apparatus, *Journal of Chemical Education*, 2010, vol. 87, no. 9, 987-991.
- 18) Lanz M., De Caro C. A., Rüegg, DeAgostini A.: Coulometric Karl Fischer titration with a diaphragm-free cell: cell design and applications, *Food Chemistry*, 2006, vol. 96, no. 3, 431-435.
- 19) <http://en.wikipedia.org/wiki/DPPH> Datum dostopa: 10. december 2011
- 20) Kiers C. T., Boer J. L. Olthof R., Spek A. L.: The Crystal Structure of a 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Modification, *Acta cryst.*, 1976; B32; 2297.
- 21) Ionita P.: Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species?, *Chem. Pap.*, 2005; 59 (1); 11-16.
- 22) Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2004; 26: 211-219.
- 23) Szabo M. R., Iditoiu C., Chambre D. in Lupea A. X.: Improved DPPH Determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Versita*. 2007 Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences.

- 24) <http://en.wikipedia.org/wiki/Glycerol> Datum dostopa: 5. maj 2012
- 25) <http://www.dow.com/safechem/optim/optim-advantage/> Datum dostopa: 25. junij 2012
- 26) Harvey Wickes Felter: The eclectic Materia Medica, Pharmacology and Therapeutics, 1992, 200-203.
- 27) UNEP Plublications, SIDS Initial Assessmant Report: Triacetin CAS N°: 102-76-1, Boston, 22-25 October 2002.
- 28) <http://en.wikipedia.org/wiki/Triacetin> Datum dostopa: 5. maj 2012
- 29) Reactchem Industrial Co., LTD.: Glycerin Triacetate (Triacetin) CAS N°: 102-76-1.
- 30) Rutesh H. D.: Overview of pharmaceutical excipients used in tablets and capsules, Drug Topics, Oct 24, 2008.
- 31) <http://www.food-info.net/uk/e/e1518.htm> Datum dostopa: 5. maj 2012
- 32) Balaban M.: Izdelava in vrednotenje suhih mikroemulzij kot dostavnih sistemov za težko topne učinkovine, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2009.
- 33) <http://www.abiteccorp.com/product-.lines/capmul> Datum dostopa: 5. maj 2012
- 34) [http://en.wikipedia.org/wiki/PEG\\_400](http://en.wikipedia.org/wiki/PEG_400) Datum dostopa: 5. maj 2012
- 35) [http://chemindustry.ru/Polyethylene\\_Glycol.php](http://chemindustry.ru/Polyethylene_Glycol.php) Datum dostopa: 25. junij 2012
- 36) [http://en.wikipedia.org/wiki/Polyethylene\\_glycol](http://en.wikipedia.org/wiki/Polyethylene_glycol) Datum dostopa: 5. maj 2012
- 37) Bevc B.: Slovenska farmacevtska terminologija na področju pomožnih snovi, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
- 38) Kahovec J., Fox R. B., Hatada K.: Nomenclature of regular single-strand organic polymers, Pure Appl. Chem., Vol. 74, No. 10, 1921-1956, 2002.
- 39) Material Safety Data Sheet: Polyethylene glycol 400.
- 40) <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v14je19.htm> Datum dostopa: 5. maj 2012
- 41) Corpet D. E., Parnaud G., Delverdier M., Peiffer G. in Tache S.: Consistent and Fast Inhibition of Colon Carcinogenesis by Polyethylene Glycol in Mice and Rats Given Various Carcinogens, Cancer Research 60; 2000; 3160-364.
- 42) Evropska farmakopeja 7th.

- 43) Harvey Wickes Felter: The eclectic Materia Medica, Pharmacology and Therapeutics, 1992, 303-305.
- 44) [http://en.wikipedia.org/wiki/Olive\\_oil](http://en.wikipedia.org/wiki/Olive_oil) Datum dostopa: 5. maj 2012
- 45) <http://www.olje-morgan.si/index.php?stran=zdravilo3> Datum dostopa: 5. maj 2012
- 46) Ferrara L. A., Raimondi A. S., d'Episcopo L., DelloRusso A., Marotta T.: Olive oil and reduced need for antihypertensive medications, Arch. Intern. Med, 2000; 160 (6); 837-42.
- 47) Romero C., Medina E., Vargas J., Brenes M. in De Castro A.: In Vitro Activity of Olive Oil Polyphenols against Helicobacter pylori; J. Agric. Food Chem, 2007, 55, 680-686.
- 48) Budiyanto A., Ahmed N. U., Wu A., Bito T., Nikaido O., Osawa T., Ueda M. in Ichihashi M.: Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB expoaire of mice; Carcinogenesis; vol. 21 no. 11, 2000, 2085.2090.
- 49) Petauer T: Leksikon rastlinskih bogastev. 1.izdaja, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana 1993: 11.
- 50) Kotar M., Brus R.: Naše drevesne vrste; Slovenska matica v Ljubljani, 1999, 17-22.
- 51) <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Abies+alba> Datum dostopa: 5. maj 2012
- 52) [http://www.quantumhealth.com/news/pycnogenol\\_about.html](http://www.quantumhealth.com/news/pycnogenol_about.html) Datum dostopa: 7. maj 2012
- 53) Saeed H., Jeongmin L., Ramon T. S., Rohdewald P., Watson R. R.: A randomized, doubleblind, placebo-controlled, prospective, 16 week cross over study to determine the role of Pycnogenol in modifying blood pressure in mildly hypertensive patients. Nutrition research. 2001; 21: 1251-1260.
- 54) Packer L., 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.
- 55) <http://www.arspharmae.com/izdelki/pycnogenol-3/> Datum dostopa: 7. maj 2012
- 56) <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/1019.html> Datum dostopa: 7. maj 2012

- 57) <http://www.drustvo-nsos.si/?p=2&a=2&id=52> Datum dostopa: 7. maj 2012
- 58) Petrassi C., Mastromarino A., Spartera C.: Pycnogenol in chronic venous insufficiency. *Phytomedicine*. 2000; 7: 383.388.
- 59) Mravlje V.: Analiza antioksidativnih spojin v skorji navadne smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) in skorji navadne jelke (*Abies alba* Mill.), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2008.
- 60) Ćajić A.: Karakterizacija in poskus identifikacije komponent antioksidativnega ekstrakta lubja navadne jelke (*Abies alba*), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
- 61) Trstenjak G.: Optimizacija ekstrakcije in izolacije antioksidativnih polifenolov iz lubja navadne jelke (*Abies alba* Mill.), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
- 62) Krakar D.: Optimizacija metod za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti lubja navadne jelke (*Abies alba* Mill.), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
- 63) Sigma-Aldrich INC, 37858 HYDRANAL-Moisture Test Kit Instruction for Use. 2011.

