

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

ALEKSANDRA ČAJIĆ

DIPLOMSKO DELO

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEKSANDRA ČAJIĆ

**KARAKTERIZACIJA IN POSKUS IDENTIFIKACIJE
KOMPONENT ANTIOKSIDATIVNEGA EKSTRAKTA
LUBJA NAVADNE JELKE (*ABIES ALBA*)**

**CHARACTERIZATION AND EXPERIMENT TO IDENTIFY
COMPONENTS OF ANTIOXIDATIVE SILVER FIR BARK
(*ABIES ALBA*) EXTRACT**

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm. Masno spektrometrijo smo opravili na Inštitutu Jožef Štefan.

Zahvala

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

Iskrena hvala delovnemu mentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. za usmerjanje in pomoč med laboratorijskim delom, za odgovarjanje na številna vprašanja in za nasvete pri pisanju diplomskega dela.

Za pomoč pri delu v laboratoriju se zahvaljujem tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo.

Mama in ata, hvala, ker sta mi omogočila študij in me ves čas podpirala. Brez vaju danes ne bi bila to, kar sem. Hvala tudi tebi Tajda za vso moralno podporo med študijem in nastajanjem diplomskega dela.

Mitja, hvala, ker si verjel vame, me spodbujal in mi pomagal priti do cilja.

In nenazadnje hvala vsem, ki ste kakorkoli pripomogli k zaključku mojega študija in nastanku tega dela.

Izjava

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

Aleksandra Čajić

Predsednik komisije: prof. dr. Stane Srčič, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Lucija Peterlin Mašič, mag. farm.

Ljubljana, 2011

VSEBINA

1 UVOD	1
1.1 LUBJE	1
1.2 RADIKALI IN ANTIOKSIDANTI	2
1.3 POLIFENOLNE SPOJINE KOT ANTIOKSIDANTI	4
1.3.1 Flavonoidi	4
1.3.2 Čreslovine (Tanini)	9
1.4 PIKNOGENOL®	12
1.5 ABIGENOL®	14
2 NAMEN DELA	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	18
3.2 KEMIKAJIJE	18
3.3 APARATURE IN OPREMA	19
3.4 METODE	20
3.4.1 Izolacija polifenolnih spojin	20
3.4.2 Analizna in preparativna HPLC	20
3.4.3 TLC	21
3.4.4 DPPH metoda za določanje antioksidativne aktivnosti polifenolnih spojin	22
3.4.5 Folin-Ciocalteau-jeva metoda za določanje vsebnosti polifenolnih spojin	23
3.4.6 Vanilin/HCl metoda za določanje vsebnosti proantocianidinov	24
3.4.7 LC/MS	26
4 EKSPERIMENTALNO DELO	28
4.1 PRIPRAVA EKSTRAKTA LUBJA NAVADNE JELKE	28
4.2 OPTIMIZACIJA PREPARATIVNE HPLC METODE	29
4.3 TLC ANALIZA	30
4.4 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI POLIFENOLNIH SPOJIN Z DPPH METODO	31
4.5 ANALIZA VSEBNOSTI POLIFENOLNIH SPOJIN IN PROANTOCIANIDINOV	32
4.6 LC/MS	34
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	35
5.1 PRIPRAVA EKSTRAKTA LUBJA NAVADNE JELKE	35
5.2 HPLC ANALIZA	36
5.3 TLC ANALIZA	40
5.4 DOLOČANJE VSEBNOSTI POLIFENOLOV IN PROANTOCIANIDINOV TER ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI POLIFENOLNIH SPOJIN	43
5.5 LC/MS	45
6 SKLEPI	65
7 LITERATURA	67

SEZNAM SLIK

Slika 1: 2-Fenilbenzopiran	5
Slika 2: Flavonoidi kot derivati različnih struktur	5
Slika 3: Mehanizem oksidacije flavonoida	7
Slika 4: Vezavna mesta za ione kovin	8
Slika 5: Strukture različnih antocianidinov.	10
Slika 6: Procianidina A-1 in A-22	11
Slika 7: Dimeri C4-C8	11
Slika 8: Dimeri C4-C6	11
Slika 9: Odstotek lipidov mrežnice zaščiteneh pred oksidacijo s posameznim antioksidantom.....	12
Slika 10: Desmetilabietospiran.....	16
Slika 11: Abietospiran.....	16
Slika 12: Potek reakcije med flavonolom in NST	22
Slika 13: Reakcija DPPH radikala z antioksidantom.....	22
Slika 14: Folin-Ciocalteu-jev reagent	23
Slika 15: Potek reakcije med vanilinom in proantocianidinom.....	25
Slika 16: Lubje FFA pomlad	28
Slika 17: Lubje Tanin jesen.....	28
Slika 18: Lubje Tanin pomlad	28
Slika 19: Nastanek emulzije tekom ekstrakcije	35
Slika 20: Kromatogram vodnega ekstrakta FFA pomlad.....	37
Slika 21: Kromatogram vodnega ekstrakta Tanin jesen	37
Slika 22: Kromatogram vodnega ekstrakta Tanin pomlad.....	37
Slika 23: Kromatogram etilacetatnega ekstrakta FFA pomlad.....	38
Slika 24: Kromatogram etilacetatnega ekstrakta Tanin jesen	38
Slika 25: Kromatogram etilacetatnega ekstrakta Tanin pomlad.....	38
Slika 26: Zbiranje frakcij ekstrakta spomladanskega FFA lubja.....	39
Slika 27: Primerjava Abigenola [®] in standarda katehina z Abigenolom [®]	39
Slika 28: Primerjava Abigenola [®] in standarda epikatehina z Abigenolom [®]	40
Slika 29: TLC plošče orošene z orositvenim reagentom vanilin/HCl	41
Slika 30: TLC plošče orošene z orositvenim reagentom NST/PEG.....	42
Slika 31: Vsebnost polifenolov, proantocianidinov in % redukcije DPPH v posameznih frakcijah.....	44
Slika 32: Korelacija med antioksidativno aktivnostjo, določeno z DPPH metodo in vsebnostjo polifenolov oz. proantocianidinov.....	44
Slika 33: LC/MS kromatogram frakcije 11	48
Slika 34: Masni spekter katehina, posnet v negativni ESI	48
Slika 35: Masni spekter katehina, posnet v pozitivni ESI.....	49
Slika 36: Način fragmentacije katehina in epikatehina v pozitivni ESI	50
Slika 37: LC/MS kromatogram frakcije 16.....	51

Slika 38: LC/MS kromatogram frakcije 8.....	51
Slika 39: Masni spekter epikatehina, posnet v negativni ESI	52
Slika 40: Masni spekter epikatehina, posnet v pozitivni ESI	52
Slika 41: Masni spekter epikatehina v frakciji 8 kot posledica presežene kapacitete kolone, posnet v pozitivni ESI	53
Slika 42: Predvidene spojine v Abigenolu®	53
Slika 43: LC/MS kromatogram frakcije 9.....	54
Slika 44: Masni spekter (epi)galokatehina, posnet v negativni ESI	54
Slika 45: Masni spekter (epi)galokatehina, posnet v pozitivni ESI.....	55
Slika 46: Način fragmentacije (epi)galokatehina v pozitivni ESI	56
Slika 47: LC/MS kromatogram frakcije 4.....	57
Slika 48: Masni spekter dimera (epi)galokatehin-(epi)galokatehin, posnet v negativni ESI	57
Slika 49: Masni spekter dimera (epi)galokatehin-(epi)galokatehin, posnet v pozitivni ESI	58
Slika 50: Hipotezni dimer (epi)galokatehin-(epi)galokatehin in produkt RDA reakcije	58
Slika 51: LC/MS kromatogram frakcije 8.....	59
Slika 52: Masni spekter dimera (epi)galokatehin-(epi)katehin, posnet v negativni ESI	59
Slika 53: Masni spekter dimera (epi)galokatehin-(epi)katehin, posnet v pozitivni ESI	60
Slika 54: Hipotezni dimer (epi)galokatehin-(epi)katehin in produkt RDA reakcije	60
Slika 55: LC/MS kromatogram frakcije 20.....	61
Slika 56: Masni spekter dimera (epi)katehin-(epi)katehin, posnet v negativni ESI	61
Slika 57: Masni spekter dimera (epi)katehin-(epi)katehin, posnet v pozitivni ESI.....	62
Slika 58: Hipotezni dimer (epi)katehin-(epi)katehin in njegov način fragmentacije	63

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Spojine v lubju različnih vrst jelk.....	15
Preglednica II: Intenzivnost reakcije nekaterih flavonoidov in kromonov z vanilinom.....	26
Preglednica III: Pogoji ionizacije	27
Preglednica IV: Prikaz pogojev in reagentov za analizo polifenolov in proantocianidinov.	33
Preglednica V: Mase suhih ekstraktov in izkoristki izolacije iz posameznih lubij	35
Preglednica VI: Retencijski časi posameznih standardov.....	39
Preglednica VII: % redukcije DPPH ekstraktov lubja navadne jelke.....	43
Preglednica VIII: Retencijski časi, molske mase in m/z vrednosti posameznih standardov	47

POVZETEK

Radikali so zelo reaktivni in lahko poškodujejo celične strukture, kar nato privede do številnih obolenj. Pred njihovim učinkom nas branijo endogeni in eksogeni antioksidanti. Med slednjimi so najbolj poznani vitamini A, C in E, vedno več pozornosti pa se posveča drugim antioksidantom, predvsem polifenolnim spojinam, natančneje proantocianidinom. Na tržišču obstaja tudi prehransko dopolnilo Pycnogenol[®], antioksidativni ekstrakt lubja obmorskega bora (*Pinus maritima* Mill.). Izvleček vsebuje flavonoide, kondenzirane čreslovine in fenolne kisline. Zanimivo je, da je bilo lubje iglavcev dolga stoletja odpadek pri proizvodnji lesa. Ekstrakt lubja navadne jelke (*Abies alba*), Abigenol[®], je lahko alternativni vir Pknogenolu[®].

V okviru diplomskega dela smo izvedli karakterizacijo in identifikacijo komponent izvlečka lubja navadne jelke, ki so odgovorne za njegovo antioksidativno aktivnost. Pripravili smo ekstrakte jesenskega in dveh vzorcev različno starega posušenega spomladanskega lubja. Za najbolj kakovostnega (največji izkoristek izolacije in antioksidativna aktivnost, določena z DPPH metodo) se je izkazal izvleček svežega spomladanskega lubja, zato smo delo nadaljevali z njim. Z optimizirano preparativno HPLC metodo smo nato zbirali posamezne frakcije, ki smo jih ovrednotili z nekaterimi testi. Prisotnost proantocianidinov in njihovo vsebnost v frakcijah smo dokazali z vanilin/HCl metodo, vsebnost polifenolov v frakcijah pa s Folin-Ciocalteau-jevo metodo. S TLC analizo z orositvenim reagentom za flavonoide s polietilenglikolom 4000 smo izključili prisotnost flavonov in flavonolov v frakcijah. Z DPPH metodo za določanje antioksidativne aktivnosti polifenolnih spojin smo ugotovili, da vse frakcije, razen frakcije 7, izkazujejo antioksidativno aktivnost. Frakcija 7 kaže prooksidativno aktivnost. Pokazalo se je, da so za antioksidativno aktivnost ekstrakta odgovorne polifenolne spojine. Frakcije smo analizirali tudi z LC/MS. Kot vir ionizacije smo uporabili negativno in pozitivno ionizacijo z razprševanjem raztopin v električnem polju (ESI). Z masno spektrometrijo smo v ekstraktu lubja navadne jelke identificirali tri flavan-3-ole in tri dimere proantocianidinov, in sicer: katehin, epikatehin, (epi)galokatehin, (epi)galokatehin-(epi)galokatehin, (epi)galokatehin-(epi)katehin oz. (epi)katehin-(epi)galokatehin in (epi)katehin-(epi)katehin. Prisotnost katehina in epikatehina smo določili tudi s HPLC in TLC.

ABSTRACT

Radicals are very reactive and can harm cell structures, which leads to numerous diseases. Endogenous and exogenous antioxidants, such as vitamins A, C and E protect us from their harmful effects. Other antioxidants like polyphenols or proanthocyanidins are becoming more and more important lately. Pycnogenol[®], antioxidative extract of French maritime pine bark (*Pinus maritima* Mill.), can also be found on the market as a food supplement. This extract consists of flavonoids, condensed tannins and phenolic acids. During centuries conifer bark was a side product in the wood industry. Silver fir bark (*Abies alba*) extract, Abigenol[®], can be an alternative source to Pycnogenol[®].

In this work we have characterized and identified components of silver fir bark extract that are responsible for its antioxidant activity. Extracts of an autumn bark and two samples of dried spring bark of different age were prepared. Fresh spring bark extract displayed the best quality (the highest efficiency of isolation and antioxidant activity according to the DPPH method), so we continued our research with it. Individual fractions were gathered by the means of preparative HPLC method. Fractions were analysed with different tests. The content of proanthocyanidins and their presence in fractions were proven with the vanillin/HCl method as well as the presence of polyphenols in fractions with the Folin-Ciocalteu method. TLC analysis with spray reagent for flavonoids was used to prove the absence of flavons and flavonols in fractions. DPPH method for estimating antioxidant activity of polyphenols has proven that all fractions but number 7 showed antioxidant activity. Fraction 7 indicated prooxidant activity. Polyphenols are responsible for antioxidant activity of the extract. Fractions were analysed with LC/MS as well. Negative and positive electrospray ionization (ESI) was used as the source of ionization. Mass spectrometry helped us identify three flavan-3-ols and three dimers of proanthocyanidins in silver fir bark extract: catechin, epicatechin, (epi)gallocatechin, (epi)gallocatechin-(epi)gallocatechin, (epi)gallocatechin-(epi)catechin or (epi)catechin-(epi)gallocatechin and (epi)catechin-(epi)catechin. The presence of catechin and epicatechin was proved also with HPLC and TLC.

SEZNAM OKRAJŠAV

DNA	Deoksiribonukleinska kislina
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
ESI	ionizacija z razprševanjem raztopin v električnem polju (ang. <i>Electrospray Ionization</i>)
FC	Folin-Ciocalteu
FFA	Fakulteta za farmacijo
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LC/MS	tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo (ang. <i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i>)
m/z	razmerje med maso in nabojem
NMR	jedrska magnetna resonanca (ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NST	Naturstoff
PEG	polietilenglikol
RNS	reaktivne dušikove zvrsti
RONs	reaktivne kisikove in dušikove zvrsti
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
TFA	trifluoroocetna kislina
TLC	tankoplastna kromatografija (ang. <i>Thin Layer Chromatography</i>)
Tof	masni analizator na čas preleta ionov (ang. <i>Time of flight</i>)
t _R	retencijski čas
UHPLC	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (ang. <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>)
UV	ultravijolično

1 UVOD

1.1 LUBJE

Pri predelavi hlodovine v žagan les nastanejo ostanki v obliki kosovnih ostankov (žamanje, krajniki, očelki), žagovine, lubja in odpadkov (prah, trske). Vsako leto se uporabi 66 % lubja za proizvodnjo toplotne energije. Pomemben del lubja ostane neuporabljen in danes žal še vedno velikokrat pomeni samo odpadke.

Lubje posameznih drevesnih vrst je lahko izhodna surovina za številne kemikalije, saj je njegova kemijska zgradba zelo raznolika in kompleksna. Danes najpogosteje izkoriščajo polifenole, ki pa se med posameznimi drevesnimi vrstami razlikujejo po vrsti in po količini. Najbolj znana industrijska uporaba lubja za izdelavo tanina je za potrebe usnjarske industrije. Vsekakor so raziskave o možnosti uporabe lubja zelo perspektivne, saj lahko med drugim njegove ekstrakte uporabimo kot komponente v lepilih za les, ionske izmenjevalce, flokulante in lužila za les z biocidnim delovanjem.

Delež lubja variira glede na starost, geografsko lego in višino drevesa. Predstavlja približno 10-15 % vsakega hloda, pri nekaterih drevesnih vrstah lahko tudi več. Primer je bor, pri kateremu delež lubja variira od 8 do 40 %. Pri navadni jelki (*Abies alba* Mill.), ki uspeva v Sloveniji, predstavlja delež lubja od 10 do 12 % (1).

Kemijska zgradba lubja je komplicirana in variira glede na lubje dreves in morfološke elemente, ki jih vsebuje. Lubje sestavljajo *ogljikohidrati, lignin, vosek, suberin, terpenoidi, monomerni polifenoli in njihovi glikozidi ter čreslovine*. Glavne komponente so ekstraktivi (polifenoli, terpenoidi, mineralne snovi, voski in drugi), celuloze, polioze, lignin, suberin in pektin. Na splošno količina ekstraktibilnih snovi in polisaharidov pada, količina lignina in polifenolnih snovi pa raste od notranjih k zunanjim plastem. V zunanjem delu lubja je dosti lignina, kar povzroča, da je ta del trd in krhek. Lubje lahko v grobem razdelimo na frakcije: vlakna, plutne celice in fina snov, ki vključuje parenhimske celice. Vlaknasta frakcija je kemijsko podobna lesnim vlaknom in je sestavljena iz celuloze, hemiceluloze in lignina. Ostali dve frakciji vsebujeta velike količine ekstraktibilnih snovi. Stene plutnih celic so impregnirane s suberinom, polifenoli pa so koncentrirani v fini frakciji. Pri sežigu lubja dobimo več kot 10 % pepela. V anorganskih snoveh, ki pri tem ostanejo, prevladuje

kalcij (82-95 %), sledita mu kalij in magnezij. Vseh ostalih elementov je manj kot 1 %. Lubje iglavcev vsebuje smolne kanale, to so medcelični prostori, ki so napolnjeni s smolo.

Mnoge ekstraktabilne snovi v lubju so topne v nevtralnih organskih topilih in hladni vodi. Beljakovine in anorganske snovi so delno ali netopne v topilih, v katerih se raztapljajo ostale ekstraktabilne snovi. Mednje spada veliko število spojin, od katerih so mnoge značilne za posamezno drevesno vrsto. Med polifenolnimi spojinami zasledimo flavonoide (predvsem flavane), kondenzirane in hidrolizabilne čreslovine, stilbene in salicin. Lubja nekaterih drevesnih vrst vsebujejo polifenole z nizko molekulsko maso v velikih količinah, da jih lahko industrijsko izkoriščamo. Med flavonoidi sta pri iglavcih najpogostejša kvercetin in njegov dihidro-analog taksifolin. Diterpeni so najpogostejše spojine znotraj terpenoidov. V nekaterih lubjih je količina ekstraktabilnih snovi že tako velika, da le-te postanejo njihove osnovne sestavine. Ekstrakcija z vročo vodo večine lubij ne odstrani velikih količin ogljikohidratov.

Lubje je potencialni vir za pridobivanje voskov, redkih maščobnih kislin in maščobnih alkoholov, ki jih lahko dobimo iz suberina lubja. Gre namreč za poliester, sestavljen predvsem iz dolgih verig maščob in hidroksimaščobnih kislin. Voski lubja, ki jih najdemo v plutastih celicah zunanjih plasti, so estri maščobnih kislin npr. lignocerojske, behenojske, dikarboksilnih in hidroksimaščobnih kislin z maščobnimi alkoholi kot npr. lignoceril- ali behenilalkohol. Voski iglavcev vsebujejo velike količine ferulne kisline. Lubje vsebuje tudi maščobe, ki jih najdemo v parenhimu notranjih plasti. Prevladujejo estri glicerola z oleinsko, linolno in linolensko kislino (2, 3).

1.2 RADIKALI IN ANTIOKSIDANTI

Radikali so atomi, ioni, molekule ali kompleksi, ki imajo v svoji strukturi vsaj en nesparjen elektron. Zaradi težnje po pritegnitvi še enega elektrona so praviloma kratkoživi in kemijsko reaktivni. Glede na atom z nesparjenim elektronom razlikujemo kisikove, dušikove, ogljikove in druge radikale (4).

Pred kakšno milijardo let je bilo v zemeljski atmosferi 1 % kisika, še prej pa ga sploh ni bilo. Do danes se je njegov delež v atmosferi povzpел na 21 %. Glavni krivec za postopno povečevanje koncentracije kisika so rastline zaradi procesa fotosinteze. S pojavom kisika v atmosferi so bili podani pogoji za pojav živalskega sveta, ki koristi zračni kisik za svoje

življenje. Zelene rastline so bile prva živa bitja, ki so se soočila s kisikom in z njegovimi reaktivnimi oblikami. Zato je razumljivo, da so le-te najboljše opremljene z antioksidanti. Živalski svet, katerega del je tudi človeštvo, je evolucijsko mlajši, vendar je prav tako neprestano izpostavljen kisiku in potrebuje učinkovito zaščito pred njegovimi kemijskimi vplivi. Mladost in prehranska odvisnost od rastlinskega sveta sta pomembna razloga, da živalski svet še ni razvil specifično svojih antioksidantov v tolikšni meri, obsegu in učinkovitosti, kot rastlinski svet (5).

Reaktivne oblike kisika, ki lahko vplivajo na organizem, imenujemo **reaktivne kisikove zvrsti** (ROS). To so kisikovi radikali in kisikove spojine, ki niso radikali, vendar pri svojih reakcijah lahko delajo radikale. $^3\text{O}_2$ (tripletni kisik) je namreč le pogojno nereaktivna molekula, in sicer tako dolgo, dokler se ne sreča z radikalom. Pri tem poteče reakcija kisika z radikalom. V nadaljnjih verižnih radikalskih reakcijah se lahko količina ROS zelo poveča. Na kisik odpadeta dve tretjini mase človekovega telesa in zato je zagotovo upravičen naše pozornosti. Ogljik in dušik sta druga temeljna sestavna dela molekul v živih organizmih. Reaktivne oblike dušika imenujemo **reaktivne dušikove zvrsti** (RNS).

Radikali lahko v organizem prihajajo tudi iz okolja (UV sevanje, onesnaženo okolje, kajenje, ksenobiotiki, etanol). Kovinski ioni lahko bistveno prispevajo k nastajanju radikalov v organizmu, kadar se čezmerno nalagajo v tkivih (Fentonova reakcija). Med drugim lahko pride do povečane tvorbe radikalov zaradi ekstremnih fizičnih obremenitev netreniranega telesa in psihičnih stresov. Prav tako je pomembna njihova vloga pri staranju (6).

Tudi pri normalnem delovanju celic nastajajo radikali (celično mitohondrijsko dihanje, fagocitoza, encimske oksidacije itd.), vendar je njihova koncentracija nizka in nadzorovana. Njihovo nastajanje je omejeno, saj jih endogeni antioksidanti (superoksidne dismutaze, katalaze, glutathion peroksidaze, glutathion, bilirubin, sečna kislina, melatonin, koencim Q, melanini) sproti odstranjujejo. Če je organizem dalj časa izpostavljen oksidantom ali/in če pride do zmanjšanja antioksidativne sposobnosti organizma, torej če se poruši ravnotežje med prooksidativnimi in antioksidativnimi procesi v celici, nastopi **oksidativni stres**. Tako v vrsti nadaljnjih in nenadzorovanih reakcij prekomerno nastajajo radikali, ki poškodujejo DNA, proteine, lipide in druge sestavine celice ter tako pomembno prispevajo k sproženju začetka bolezenskega procesa. Patološka stanja, kjer se pojavljajo radikali v povečanem obsegu in so odgovorni za vrsto celičnih oz. tkivnih poškodb so med

drugim sevalna bolezen, vnetje in revmatidni artritis, rak, ateroskleroza, okvare ob ishemiji-reperfuziji in kronično pomanjkanje selen (Keshanska bolezen) (4, 5, 7).

Antioksidant je vsaka snov, ki že v zelo nizki koncentraciji opazno upočasni ali prepreči oksidacijo drugih snovi v celici. Njihove prevelike količine pa vodijo v nasprotno učinke. Antioksidanti oksidativni stres preprečujejo z lovljenjem radikalov, s keliranjem kovinskih ionov ter z odstranjevanjem ali/in popravilom oksidativno poškodovanih biomolekul. Endogeni antioksidanti so učinkoviti, vendar v sodobnem času ne zadoščajo v obrambi pred radikali, zato skušamo škodljive vplive zmanjšati z vnosom eksogenih antioksidantov kot so vitamini A, C in E, minerali (cink, selen), žveplove spojine, organske kisline in polifenoli. Med antioksidanti iz rastlin so najpomembnejše **fenolne spojine**, med katerimi imajo antioksidativno delovanje *fenolne kisline* (cimetova, kavna, kumarna, rožmarinska kislina), *flavonoidi* (rutin iz črnega bezga), *čreslovine* (katehini iz listov čajevca, proantocianidini iz lubja obmorskega bora), *lignani* in *stilbeni* (5, 8, 9).

Vpletenost antioksidantov v preprečevanje razvoja patoloških procesov in zaviranje procesov staranja povečuje pomen razvoja antioksidantov kot zdravih učinkovin. Z njihovo pravilno uporabo bi razvoj mnogih bolezni preprečili ali upočasnili že na samem začetku. To pomeni, da na tem področju z veliko verjetnostjo pričakujemo nova zdravila (7).

1.3 POLIFENOLNE SPOJINE KOT ANTIOKSIDANTI

Fenolne spojine predstavljajo strukturno zelo različno skupino spojin. To so vse tiste spojine, ki imajo v svoji strukturi najmanj en aromatski obroč in na njem direktno vezano vsaj eno ali več hidroksilnih skupin. Spojine z več hidroksilnimi skupinami so v naravi pogoste. Zanje se je uveljavilo ime polifenoli. Tudi sekundarni metaboliti, ki se uvrščajo v povsem druge skupine fitokemijskih spojin, imajo v svoji strukturi prav tako elemente, ki so značilni za polifenole - aromatski obroč in hidroksilno skupino. Tak primer so nekateri terpenoidi (timol, karnozol, gosipol) in alkaloidi (morfin, boldin) (10, 11).

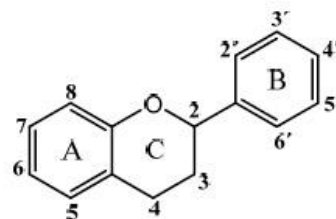
1.3.1 Flavonoidi

Flavonoidi so zelo razširjeni rastlinski pigmenti. Dajejo barvo cvetovom, plodovom in redkeje listom. Rumene barve so halkoni, auronin in nekateri flavonoli, rdeče, vijolične ali

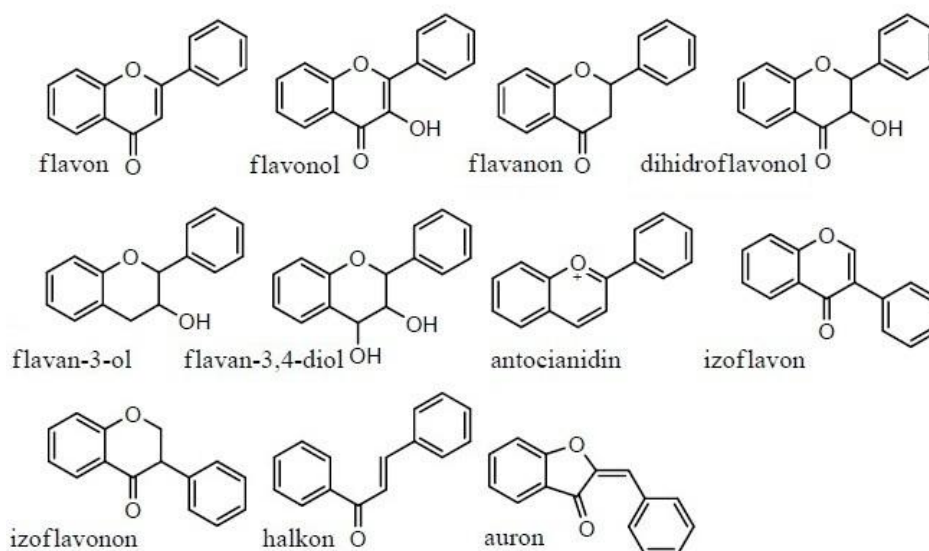
modre barve pa antocianini. Prisotni so tudi kot brezbarvni kopigmenti, ki varujejo nestabilne antocianine. Večinoma so vodotopni. Nekateri absorbirajo bližnjo UV svetlobo - to barvo vidijo le žuželke, ki oprašujejo cvetove. Funkcije flavonoidov v rastlini so še zaščita pred škodljivimi insekti, virusi in glivicami, zavirajo delovanje različnih encimov, vplivajo na oksidacijske in redukcijske procese v celici, poleg tega pa varujejo celice in tkiva pred poškodbami z UV žarki.

Vsi flavonoidi (približno 4000 različnih spojin) imajo enak biosintezni izvor, zato so si njihove strukture zelo podobne. Njihovi aglikoni imajo 2-fenilbenzopiranski oz. 2-fenilkromanski skelet (slika 1), razlikujejo pa se v oksidacijski stopnji piranovega obroča. So polihidroksi in/ali polimetoksi derivati naslednjih struktur (slika 2):

- 2-fenilbenzopirolija (antocianini, antocianidini),
- 2-fenilkromona (flavoni, flavonoli in njihovi dimeri, flavanoni, dihidroflavonoli),
- 3-fenilkromona (izoflavoni, izoflavanoni),
- 2-fenilkromana (flavani, flavan-3-oli, flavan-3,4-dioli),
- odprtega piranskega obroča (halkoni in dihidrohalkoni),
- furanskega obroča; piranski obroč se odpre in ciklizira nazaj v furanov obroč (auroni).



Slika 1: 2-Fenilbenzopiran (10).



Slika 2: Flavonoidi kot derivati različnih struktur (10).

Nekateri avtorji označujejo kar vse te spojine, zaradi njihove podobnosti v strukturi, z izrazom flavonoidi. Če pa želimo razlikovati med seboj flavonoide po njihovih določenih

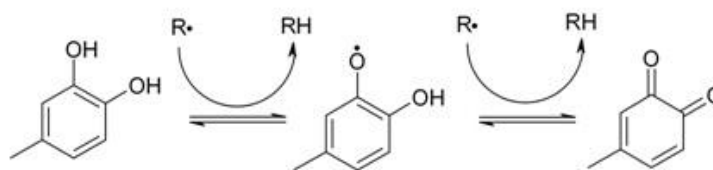
lastnostih in vedenju, potem jih razdelimo na *flavonoide v ožjem* in *flavonoide v širšem smislu*. K prvim spadajo flavoni, flavonoli, njihovi dihidrogen derivati in dimeri, auronin in halkoni. Izoflavonoidi, antocianini in derivati flavanov pa spadajo k flavonoidom v širšem pomenu. Vse te skupine flavonoidov imajo praviloma vsaj tri fenolne hidroksilne skupine na mestih 5, 7 in 4' aglikona. Znani so tudi metoksi derivati.

Flavonoidi so pogosto v obliki glikozidov. Sladkorna komponenta je lahko monosaharid, disaharid ali trisaharid. Najpogostejši sladkorji so glukoza, galaktoza, ramnoza, aloza, arabinoza, ksiloza, apioza, glukuronska in galakturonska kislina. Največkrat gre za O-glikozide. Pri njih je lahko glikozilirana katerakoli hidroksilna skupina aglikona, največkrat pa na mestu 7 ali 3. Posamezni monosaharidi so lahko acilirani, znanih pa je tudi nekaj sulfatov. Manj pogosti so C-glikozidi. Pri njih se ogljik sladkorja (glukoza, galaktoza ali pentoza) poveže z C-6 ali C-8 aglikona. Nekateri glikozidi so hkrati O- in C-glikozidi.

Flavonoidom pripisujejo več različnih bioloških aktivnosti. Izkazujejo vazoaktivno (zmanjšujejo krhkost in prepustnost kapilar), protivnetno, protialergeno in protivirusno delovanje. Inhibirajo veliko število encimov (protein kinazo C, reverzno transkriptazo, histidin dekarboksilazo, hialuronidazo in druge). Pripisujejo jim tudi antispazmolizno, protirakavo, antitrombotično, diurezno in protimikrobno delovanje, zmanjšujejo nivo holesterola v krvi ter ščitijo jetra. Največji interes je pa posvečen njihovemu antioksidativnemu delovanju (10).

Zaradi fenolnih hidroksilnih skupin delujejo flavonoidi kot lovilci reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti (RONS), kelatorji kovinskih ionov, z redukcijo α -tokoferoksil radikala nazaj v α -tokoferol pa regenerirajo ta lipidotopen antioksidant. Njihov antioksidativni učinek je tudi posledica inhibicije encimov, ki so vključeni v tvorbo ROS (ksantin oksidaza, protein kinaza C, lipoksigenaza in drugi) in stimulacije encimskih antioksidantov (glutation reduktaza). Flavonoidi so aktivni tako v hidrofilnih kot tudi v lipofilnih sistemih. S tem so prisotni na vseh mestih v celici, kar pomeni zadovoljivo zaščito pred radikali. Flavonoidi imajo nizek redoks potencial in so zato dobri donorji vodika. V reakciji (slika 3) se njihov vodikov atom poveže z radikalom, pri čemer nastane bolj stabilen flavonoidni fenoksi oz. *orto*-semikinonski radikal. Slednji je stabilen zaradi resonančne delokalizacije nesparjenih elektronov okrog aromatskega obroča. *orto*-Semikinonski radikal se lahko nato oksidira do še bolj stabilnega *orto*-kinona. Tako lahko molekula flavonoida reducira dva

škodljiva radikala; semikinonski radikal je relativno stabilen in kljub temu, da je kratkoživ, lahko reducira še en škodljiv radikal in s tem prepreči njegovo škodljivo delovanje (12, 13, 14).



Slika 3: Mehanizem oksidacije flavonoida (13).

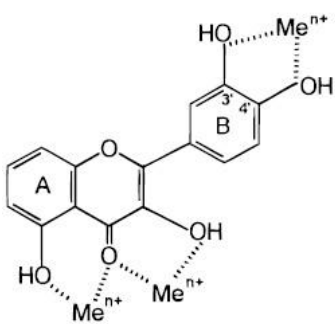
Na splošno se torej antioksidant oksidira v stabilnejši in manj škodljiv (reaktiven) radikal. Radikalske reakcije so tako prekinjene in vitalni deli celic zavarovani pred poškodbami. Nov radikal, ki nastane se lahko regenerira ali pa izloči iz telesa. Molekule kot so *orto*-kinoni pa lahko prosto reagirajo z nukleofili. To je bilo dokazano že velikokrat. *orto*-Kinoni se lahko konjugirajo z glutationom, pri čemer *orto*-kinon reagira z $-SH$ skupino glutationa in nastaneta dva glutationska konjugata. Na ta način lahko izčrpajo zaloge glutationa v celičnih kulturah in povzročijo oksidativni stres, čeprav se verjetno *orto*-semikinonski radikal, ki nastane z oksidacijo molekule flavonoida, reducira nazaj do flavonoida z askorbatom *in vivo*. *orto*-Kinoni lahko tudi poškodujejo sestavine celic. *orto*-Semikinonski radikal lahko, namesto da bi ustavil verižno reakcijo, reagira s kisikom. Pri tej reakciji se tvori *orto*-kinon in superoksidni anion. Reakcija lahko poteče v prisotnosti velikih količin kovinskih ionov in je odgovorna za nezaželen prooksidativni učinek flavonoidov. Tako je skupna antioksidativna sposobnost flavonoidov odvisna od redoks potenciala para flavonoid- $O^{\bullet}$ (*orto*-semikinonski radikal)/flavonoid-OH in od morebitnih stranskih reakcij *orto*-semikinonskega radikala (5, 13, 15).

Na sposobnost lovljenja radikalov in keliranja kovinskih ionov pa vplivajo število, položaj in vrsta funkcionalnih skupin. Sam 2-fenilbenzopiranski skelet namreč nima antioksidativnega delovanja. V študijah, ki so raziskovale odnos med strukturo flavonoidov in njihovo antioksidativno aktivnostjo so ugotovili, da je za dobro antioksidativno aktivnost ugodna prisotnost:

- *hidroksilnih skupin na mestih 3' in 4'*. Prisotnost teh skupin omogoči večjo stabilizacijo flavonoidnega fenoksi radikala, ker sodelujejo v delokalizaciji elektronov.

- dvojne vezi na mestu 2 in 3 in okso skupine na mestu 4. Te medsebojno konjugirane skupine tudi sodelujejo v delokalizaciji elektronov. Flavonoidi, ki nimajo ene od teh skupin so slabši antioksidanti kot tisti, ki imajo obe.
- hidroksilne skupine na mestu 3. Prisotnost te skupine zmanjša torzijski kot med obročem B in ostalim delom molekule (obroč A in B) in zveča koplanarnost molekule ter možnost konjugacije. V primeru glikozilacije te skupine je aktivnost nekoliko manjša, če pa je ta skupina odsotna se aktivnost še zmanjša, kar je posledica zvečanja torzijskega kota.

Dodatni hidroksilni skupini na mestu 5 ali 7 obroča A skorajda ne prispevata k zvečanju antioksidativne aktivnosti, zmanjša pa jo zamenjava hidroksilnih skupin z metoksi skupinami ali njihova glikozilacija zaradi sprememb v koplanarnosti. Sladkorna enota prav tako hidroksilnim skupinam odvzame vodik, ki sodeluje v reakciji lovljenja radikalov. Doprinese tudi k hidrofilnosti in tako otežuje dostop molekule v lipidni dvosloj. Več kot je sladkornih enot, manjša je antioksidativna aktivnost. Vpliv imata tudi vrsta in lega sladkorne enote (ramnoza v primerjavi z rutinozo in vezava sladkorja na obroč A v primerjavi z vezavo na obroč C bolj zmanjša antioksidativno aktivnost). Metiliranje hidroksilnih skupin poveča lipofilnost flavonoida. Piranski obroč je lahko odprt, kar potrjuje dejstvo, da so tudi halkoni aktivni antioksidanti. Zraven hidroksilnih skupin na mestih 3' in 4' dodatna hidroksilna skupina v obroču B (pirogalo) poveča antioksidativno aktivnost. Ko pa je v tem obroču prisotna le ena hidroksilna skupina se antioksidativna aktivnost zmanjša.



Slika 4: Vezavna mesta za ione kovin (13).

Kompleksi s kovinskimi ioni (najpomembnejša sta železo in baker) se lahko tvorijo med 3'- in 4'-hidroksilno skupino, med 3-hidroksilno in 4-okso skupino ter med 5-hidroksilno in 4-okso skupino (slika 4). Glikozilacija nima pomembnega vpliva na sposobnost kompleksiranja. Ni nujno, da postane flavonoid po keliranju neaktiven. Tudi tvorjen kompleks lahko lovi radikale (12, 13, 16).

Antioksidativni potencial flavonoidov *in vivo* je odvisen predvsem od njihove biološke razpoložljivosti. Raziskave o absorpciji in metabolizmu flavonoidov pri ljudeh so bile do sedaj opravljene le na manjšem številu flavonoidov. Čeprav farmakokinetika flavonoidov

še ni dokončno raziskana pa obstajajo dokazi, ki navajajo, da je njihov obseg absorpcije zadosten, da lahko izkazujejo *in vivo* antioksidativen učinek. Delež absorpcije po peroralni aplikaciji namreč normalno ne preseže nekaj odstotkov (5-10 %). Na biološko uporabnost vpliva tudi hrana. Beljakovine in železo zaradi tvorbe kompleksov s flavonoidi zmanjšajo obseg absorpcije, medtem ko jo alkohol in maščobe povečajo. V tankem črevesu poteče hidroliza glikozidov flavonoidov z glukozidaznimi encimi ali pa s črevesnimi bakterijami. Nekateri glikozidi pa se na tem mestu ne razgradijo do aglikonov, temveč se absorbirajo s pomočjo prenašalcev za glukozo (npr. kvercetin-3-glukozid). Maksimalna plazemska koncentracija flavonoidov nastopi v dveh urah po peroralni aplikaciji flavonoidov. Pri metabolizmu faze I in II v gastrointestinalnem traktu in v jetrih poteče hidroliza glikozidov do njihovih ustreznih aglikonov, hidroksilacija, cepitev heterocikla, tvorijo se še glukoronidi, sulfati in produkti *O*-metiliranja. Flavonoidi so v veliki meri podvrženi tudi presnovi z encimi črevesnih bakterij v debelem črevesju. Metaboliti so različne fenolne kisline, ki se lahko absorbirajo. Določene kisline med njimi imajo še vedno antioksidativno aktivnost. V prihodnosti bi se moralo izvesti še več raziskav, ki bi natančneje opredelile obseg absorpcije v zvezi s strukturo flavonoidov in njihovo farmakokinetiko. Prav tako bi bilo potrebno še okarakterizirati metabolite, določiti njihov odnos med strukturo in delovanjem in njihov vpliv na zdravje ljudi (12, 13, 17).

1.3.2 Čreslovine (Tanini)

Čreslovine so kompleksne polifenolne spojine, ki so topne v vodi, z beljakovinami pa tvorijo netopne komplekse. Razdelimo jih na:

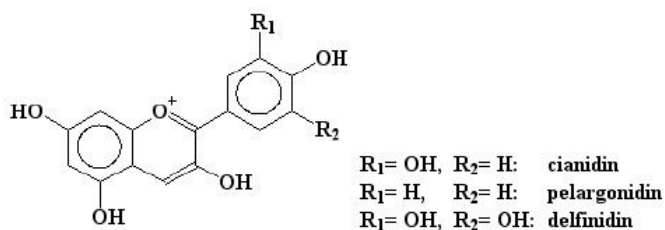
- *hidrolizabilne čreslovine*, ki so estri sladkorja in različnega števila fenolnih kislin.
- *kondenzirane čreslovine*, ki so dimeri, oligomeri ali polimeri flavan-3-ola.
- *mešane čreslovine*, kjer se na kondenzirane čreslovine estrsko veže ena ali več galnih kislin.

Tanini obarjajo pektine in beljakovine. Zaradi te lastnosti imajo adstringentni učinek in trpek okus. Pri adstrinkciji gre samo za površinsko delovanje na koži in sluznici, trpek okus pa je posledica obarjanja glikoproteinov v slini. Večina bioloških učinkov taninov je povezanih z njihovo sposobnostjo, da tvorijo komplekse z makromolekulami - zlasti z beljakovinami. Tako so notranje antidiaroiiki. Na sluznici napravijo zaščitno plast iz koaguliranih beljakovin in tako zaščitijo globlje plasti - vnetje se ublaži, draženje zmanjša

in peristaltika se umiri. Podoben (adstringentni) učinek imajo tudi na koži in na drugih sluznicah. Zaustavljajo manjše krvavitve in blago tonizirajo kožo. Kot fenoli imajo antiseptični učinek. So tudi inhibitorji encimov (angiotenzin konvertaze, protein-kinaze C, topoizomeraze in drugih). Izkazujejo vazoaktivno (zmanjšujejo krhkost in prepustnost kapilar), protirakavo, protivirusno, vazodilatatorno delovanje na koronarke in pozitiven inotropni efekt. Tanini so tudi antioksidanti. S stališča antioksidativnega delovanja so zanimive predvsem kondenzirane čreslovine.

Kondenzirane čreslovine

Imenujemo jih tudi **proantocianidini**. Delimo jih na **procianidine**, **prodelfinidine** in **propelargonidine**, glede na to, kakšen antocianidin nastane iz polimera pri segrevanju v kislem: cianidin, delfinidin ali pelargonidin (slika 5). Najpogostejše kondenzirane čreslovine so procianidini, ki so polimeri katehina in/ali epikatehina. Te čreslovine imenujemo *katehinske čreslovine*.



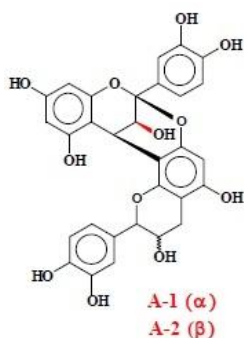
Slika 5: Strukture različnih antocianidinov (10).

Proantocianidini so bili izolirani ali identificirani v vseh taksonomskih deblih rastlin, tudi v golosemenkah (Gymnospermae) in v praprotnicah (Pteridophyta). Pri golosemenkah so proantocianidini zelo pogosti. Porazdelitev teh spojin v rastlini se zelo razlikuje v odvisnosti od funkcije organa (les, lubje, iglice).

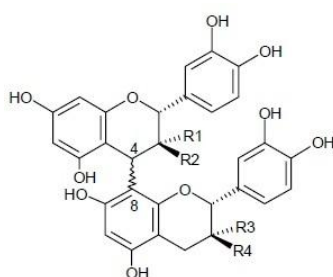
Osnovni strukturni element kondenziranih čreslovin je *flavan-3-ol*. Ta ima dva kiralna centra - na mestih 2 in 3. Enantiomeri kot je ent-katehin (2S,3S) so precej manj pogosti kot enantiomeri (2R,3S) ali (2R,3R). Oligomeri in polimeri nastajajo s postopnim dodajanjem flavonoidnih enot. Enot flavan-3-ola se lahko med seboj povežejo z vezjo med C-4-C-8 ali redkeje C-4-C-6. Gre za *B tip proantocianidinov*. Med monomernimi enotami je lahko prisotna še dodatna etrska vez. Običajno gre za C-2-O-C-7, redkeje pa za C-2-O-C-5 etrske vezi. Proantocianidine, ki med monomernimi enotami vsebujejo obe, tako C-C kot tudi etrsko vez (C-O-C), imenujemo *proantocianidini tipa A*. Pri poimenovanju

proantocianidinov lahko uporabimo zanje značilne oznake (npr. B-1, B-2, B-3) ali pa navedemo imena monomernih enot in v oklepaju še mesto ter konfiguracijo α ali β interflavanske (ih) vezi. Dimer B-1 bi tako poimenovali: epikatehin-(4 β -8)-katehin.

Najenostavnejši dimeri proantocianidinov so B-1, B-2, B-3 in B-4, ki se razlikujejo v tem, ali sta med seboj povezana dva katehina ali dva epikatehina ali katehin in epikatehin ter v α (B-3 in B-4) ali β (B-1 in B-2) konfiguraciji C-4-C-8 vezi. Ti procianidini se pojavljajo v prosti obliki in so v naravi široko zastopani. Druga pomembna skupina dimerov proantocianidinov so A-1 in A-2 dimeri, ki so povezani z dvema vezema, in sicer z C-4-C-8 in C-2-O-C-7. A-1 ima obe povezavi α , A-2 pa β . Drugi dimeri (propelargonidini, prodelfinidini) so manj pogosti. Poznamo tudi C-6'-C-6' dimere, dimere s halkoni ter dimere enantiomerov kot je na primer ent-procianidin. Najbolj razširjeni polimeri so poliepikatehini in procianidin-prodelfinidin kopolimeri. Drugi polimeri (propelargonidini in ent-flavan-3-ol polimeri) so precej manj pogosti. Poznamo tudi O- in C-glikozide kondenziranih čreslovin. Monomer lahko s kavno kislino tvori lakton, proantocianidini pa z galno kislino njihove ustrezne estre (10). Primeri procianidinov so prikazani na slikah 6, 7 in 8.

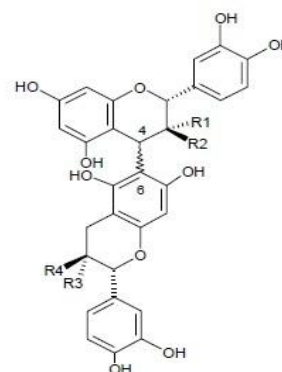


Slika 6: Procianidina A-1 in A-22 (10).



Dimeri C4-C8
B1 (epi-kat) : $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=H$; $R_4=OH$
B2 (epi-epi) : $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=OH$; $R_4=H$
B3 (kat-epi) : $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=H$; $R_4=OH$
B4 (kat-kat) : $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=OH$; $R_4=H$

Slika 7: Dimeri C4-C8 (18).



Dimeri C4-C6
B5 (epi-epi) : $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=OH$; $R_4=H$
B6 (kat-kat) : $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=H$; $R_4=OH$
B7 (epi-kat) : $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=H$; $R_4=OH$
B8 (kat-epi) : $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=OH$; $R_4=H$

Slika 8: Dimeri C4-C6 (18).

Zaradi relativne kompleksnosti in raznolikosti procianidinov je odnos med strukturo in delovanjem manj znan. Ugotovili so, da:

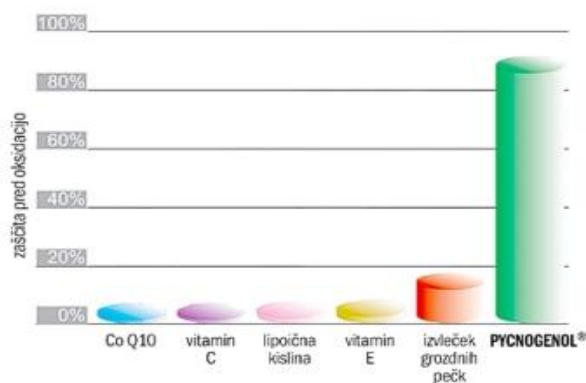
- se z večanjem stopnje polimerizacije do neke točke večja tudi antioksidativna aktivnost. Pri tem je na voljo več hidroksilnih skupin, ki so potencialni donorji vodikovih atomov.

- ima tudi interflavanska povezava pomemben vpliv na antioksidativno delovanje flavonoidov. C-4-C-6 dimeri so močnejši antioksidanti v vodnih fazah. C-4-C-8 dimeri so namreč bolj lipofilni kot dimeri C-4-C-6.
- imata monomera katehin in epikatehin enako antioksidativno aktivnost. To pomeni, da stereokemija obroča C nima pomembnega vpliva.
- tvorba estrov z galno kislino na mestu C-3 poveča antioksidativni učinek, najbrž zaradi povečanja števila prostih hidroksilnih skupin (18).

Zaradi visoke molekulske mase polimernih procianidinov je za njihovo absorpcijo sprva potrebna razgradnja s pomočjo črevesnih bakterij in nizkega pH v želodcu do manjših, nizkomolekularnih enot. Procianidinski dimeri, trimeri do heptameri, ne pa višji oligomeri, so odporni na hidrolizo z želodčno kislino in se absorbirajo s translokacijo preko črevesnega epitela. Razgradnja v velikem obsegu poteče do monomernih katehinskih enot in do fenolnih kislin (12).

1.4 PIKNOGENOL[®]

Piknogenol[®] je zaščitena blagovna znamka, ki se nanaša tako na ekstrakt kot tudi na gotov proizvod (Piknogenol[®] ekstrakt, Piknogenol[®] gel in tablete). Vir Piknogenola[®] so širne gozdne plantaže na JZ Francije. Ekstrakt pridobivajo iz lubja obmorskega bora (*Pinus maritima* Mill.). Piknogenol[®] se od drugih izdelkov na tržišču razlikuje v obsežnih raziskavah, ki so bile opravljene. Je tudi učinkovitejši oz. močnejši od ostalih antioksidantov, s katerimi so ga primerjali.



Slika 9: Odstotek lipidov mrežnice zaščiteneh pred oksidacijo s posameznim antioksidantom (20).

To kaže tudi *in vitro* študija, kjer so ugotavljali odstotek lipidov mrežnice, ki so bili zaščiteni pred oksidacijo po dodatku enakih koncentracij različnih antioksidantov. Graf odvisnosti zaščite lipidov pred oksidacijo prikazuje slika 9 (19, 20).

Njegova sestava še ni popolnoma pojasnjena. Glavne sestavine Piknogenola[®] so *fenolne spojine*. Ekstrakt vsebuje *monomere* (katehin, epikatehin, taksifolin) in *kondenzirane*

čreslovine (procianidine). Gre za dimere do heptamere katehina in epikatehina (B1, B3, B6, B7 in drugi). Prevladujejo pa oligomeri s 5-7 enotami. Izvleček vsebuje še *fenolne kisline* (kavna, ferulna, *p*-hidroksibenzojska, vanilna kislina). Vse našteje sestavine so lahko tudi v obliki glikozidov. V njem najdemo še *Fe, Cu, Zn, Mn, Se, Ca in K*. V sledovih so zasledili tudi *galokatehine ter njihove di- in trimere*.

Ugotovili so, da ima lubje različnih vrst bora podobno kemijsko zgradbo (polifenoli, proantocianidini, lignini), vendar med njimi prihaja do razlik v količini teh spojin. Identificirali so katehin, epikatehin, taksifolin, fenolne kisline (npr. galna, protokatehajska kislina), povečini pa dimere, trimere, oligomere in polimere procianidinov. Enote flavan-3-ola so med seboj povezane predvsem z vezjo med C-4 in C-8. Lubje vsebuje še oksidabilne nefenolne polarne spojine, reducirajoče polarne spojine (kisline in sladkorji), voske in druge lipide. Pokazalo se je tudi, da procianidini ne tvorijo estrov z galno kislino in da je potencialna antioksidativna aktivnost ekstrakta lubja signifikantno odvisna od vsebnosti proantocianidinov (19, 21, 22, 23).

Pozitivni učinki Pknogenola[®] so številni, med njimi pa je najbolj poznano njegovo močno antioksidativno delovanje. Ključen pomen pri tem imajo, kot že omenjeno, proantocianidini. Celokupen učinek ekstrakta je večji od vsote posameznih učinkov, kar kaže na sinergizem med fenolnimi spojinami. Pknogenol[®] je lovilec RONS ter kelator kovinskih ionov. Vpliva tudi na delovanje drugih antioksidantov, saj regenerira oksidirano obliko vitamina C in ščiti vitamin E in glutation pred oksidacijo. Inhibira encime (ksantin oksidazo, lipoksigenazo), ki so vključeni v tvorbo ROS. Z neznanim mehanizmom aktivira gene za antioksidativne encime v celici, kar dopolnjuje celokupni antioksidativni potencial. Študije kažejo, da ima ekstrakt zraven antioksidativnega delovanja tudi druge učinke, ki pa niso neposredno povezani z lovljenjem radikalov in s keliranjem kovinskih ionov (inhibicija encimov in modulacija genske ekspresije). Same mehanizme delovanja, ki so odgovorni za posamezne učinke Pknogenola[®], morajo še raziskati. Pknogenol[®] vpliva tudi na kardiovaskularni sistem, saj deluje kot vazorelaksans, inhibitor encima angiotenzin konvertaze, inhibitor zlepljanja trombocitov in izboljša mikrocirkulacijo. Vpleta se v vnetne procese in imunski sistem. Je inhibitor encima elastaze in inhibitor encima alfa-glukozidaze ter tako znižuje koncentracijo glukoze v krvi.

Ker je Pknogenol[®] na tržišču kot prehransko dopolnilo mu ne moremo pripisati nobenih zdravih učinkov. Priporoča se za ohranjanje zdravja, koncentracije in delovne

storilnosti, pri povečanem psihofizičnem stresu, pri vseh športnih aktivnostih, za zmanjšanje tveganja nastanka srčno-žilnih obolenj in za lajšanje težav pri vnetju sklepov. Gre za zdravstvene trditve, ki se lahko navajajo na prehranskih dopolnilih če se znanstveno dokazane. Zaradi kombinacije prej naštetih načinov delovanja pa bi lahko bila terapevtska indikacija Piknogenola[®] obsežna. Uporabljali bi ga lahko pri sladkorni bolezni, aterosklerozi, hipertenziji, Alzheimerjevi in Parkinsonovi bolezni, za zdravljenje virusa humane imunске pomanjkljivosti, za zmanjšanje rizika nastanka rakavih obolenj in pri vseh drugih boleznih za katere so odgovorni radikali (19, 22).

1.5 ABIGENOL[®]

Raziskave, ki potekajo na Fakulteti za farmacijo, kažejo na to, da so tudi v nekaterih drugih iglavcih, ne le v boru, podobne zmesi polifenolov, ki so enakovredna oz. učinkovitejša alternativa Piknogenolu[®]. Izsledke je Katedra za farmacevtsko biologijo tudi patentirala in zmes polifenolov iz lubja navadne jelke poimenovala Abigenol[®]. Z izrazom Abigenol[®], ki je zaščitená blagovna znamka, torej poimenujemo ekstrakt kot tudi gotov proizvod (Abigenol[®] ekstrakt, Abigenol[®] tablete).

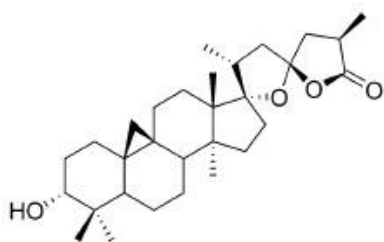
Tako kot obmorski bor tudi navadna jelka (*Abies alba*) spada v družino borovk (Pinaceae). Iz lubja navadne jelke pridobivajo terpentín in terpentínovo eterično olje ter eterično olje iz iglic in mladih poganjkov. Oba sestavljajo pretežno monoterpenski ogljikovodiki. V farmaciji se terpentínovo eterično olje uporablja kot ekspektorans in rubefaciens. Eterično olje iz iglic in mladih poganjkov pa se uporablja za inhalacije pri prehladih, bronhitisu, astmi in pljučnici ter za vtiranje pri revmi in zdravljenju ekcemov ter kožnih bolezni (10).

V goratih predelih Azije, srednje, južne in zahodne Evrope ter severne in srednje Amerike in severne Afrike se pojavlja približno 50 vrst jelk. Do sedaj so opravili raziskave na 19-ih vrstah jelk, iz katerih so izolirali 277 spojin. Večinoma gre za terpenoide (med temi prevladujejo derivati triterpenov), flavonoide in lignane, v manjši meri pa za fenole, steroide, maščobne kisline in maščobne alkohole. V preglednici I so zbrani podatki o do sedaj odkritih spojinah v lubju različnih vrst jelk (24).

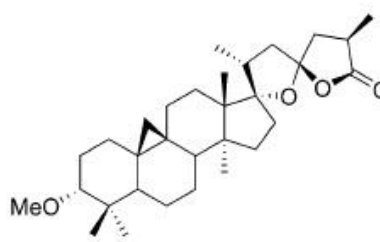
Preglednica I: Spojine v lubju različnih vrst jelk (24).

Spojina	Skupina spojin	Vrsta jelke
(24S)-3-okso-9 β -lanost-7-en-24,25-diol	triterpen	<i>A. sachalinensis</i> (sahalinska jelka)
(23R)-3 β -hidroksi-9 β -lanosta-7,24-dien-26,23-olid	triterpen	<i>A. firma</i> (japonska jelka), <i>A. veitchii</i> (Veitcheva jelka)
abieslakton	triterpen	<i>A. veitchii</i> (Veitcheva jelka)
(23R)-3-okso-9 β -lanosta-7,24-dien-26,23-olid	triterpen	<i>A. firma</i> (japonska jelka), <i>A. mariesii</i> (Mariesova jelka)
abiesolidinska kislina	triterpen	<i>A. sachalinensis</i> (sahalinska jelka)
metil((23R,25R)-3,4-seko-9 β -lanosta-4(28),7-dien-26,23-olid-3-olat	triterpen	<i>A. sachalinensis</i> (sahalinska jelka)
neoabieslakton	triterpen	<i>A. mariesii</i> (Mariesova jelka)
(23R)-3 α ,11 α -dihidroksi-7-oksolanosta-8,24-dien-26,23-olid	triterpen	<i>A. mariesii</i> (Mariesova jelka)
(23R)-1 α ,3 α ,11 α -trihidroksi-7-oksolanosta-8,24-dien-26,23-olid	triterpen	<i>A. mariesii</i> (Mariesova jelka)
veitchiolid	triterpen	<i>A. veitchii</i> (Veitcheva jelka)
spiromarienonol A	triterpen	<i>A. mariesii</i> (Mariesova jelka)
spiromarienonol B	triterpen	<i>A. mariesii</i> (Mariesova jelka)
(23R,25R)-3,4-seko-17,14-friedo-9 β -lanosta-4(28),6,8(14)-trien-26,23-olid-3-ojska kislina	triterpen	<i>A. sachalinensis</i> (sahalinska jelka)
gamaceran-3,21-dion	triterpen	<i>A. mariesii</i> (Mariesova jelka)
3 α -hidroksigamaceran-21-on	triterpen	<i>A. mariesii</i> (Mariesova jelka)
gamaceran-3 β ,21 α -diol	triterpen	<i>A. veitchii</i> (Veitcheva jelka), <i>A. mariesii</i> (Mariesova jelka)
gamaceran-3 α ,21 β -diol	triterpen	<i>A. mariesii</i> (Mariesova jelka)
hopan-3 α ,22-diol	triterpen	<i>A. veitchii</i> (Veitcheva jelka), <i>A. mariesii</i> (Mariesova jelka)
hopan-3 β ,22-diol	triterpen	<i>A. mariesii</i> (Mariesova jelka)
β -sitosterol	steroid	<i>A. firma</i> (japonska jelka)
kampesterol	steroid	<i>A. firma</i> (japonska jelka)

Raziskav o podrobnejši sestavi lubja navadne jelke še ni. V njem so do sedaj odkrili triterpena *desmetilabietospiran* in *abietospiran* (sliki 10 in 11). Predvidevajo, da naj bi iz desmetilabietospirana z metiliranjem hidroksilne skupine *in vivo* nastajal abietospiran. Desmetilabietospiran izkazuje sposobnost tvorbe gela. Raziskovalci so mnenja, da je slednje lahko posledica tvorbe vodikove vezi med hidroksilno skupino in spirolaktonom, ki je na nasprotni strani molekule (25).



Slika 10: Desmetilabietospiran (25).



Slika 11: Abietospiran (25).

V lubju navadne jelke so identificirali še glikoproteina AAA1 in AAA2, več maščobnih kislin (palmitinska, linolna, linolenska, oleinska, 14-metilheksadekanojska kislina) in še nekaj diterpenskih kislin (abietinska, dehidroabietinska, neoabietinska, livopimarna, palustrinska, pimarinska, izopimarinska in sandarakopimarinska kislina) (26).

V okviru diplomskega dela iz leta 2008 so ugotovili, da lubje navadne jelke predstavlja boljšo alternativo za lubje obmorskega bora kot pa lubje navadne smreke. Z DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) metodo za določanje antioksidativne aktivnosti polifenolnih spojin so namreč ugotovili, da ima ekstrakt lubja smreke 0,6-kratno, ekstrakt lubja jelke pa 1,6-kratno antioksidativno aktivnost Piknogenola[®]. S pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) so lahko sklepali, da je lubje jelke tudi po vrstah spojin, ki jih vsebuje, bolj sorodno lubju bora kot pa je to lubje smreke. Ekstrakt smrekovega lubja je imel namreč bistveno bolj enostaven kromatogram kot Piknogenol[®]. Prekrivanje teh dveh kromatogramov ni dalo praktično nobene podobnosti. Kromatogram ekstrakta lubja jelke je bil bistveno bolj podoben Piknogenolu[®]. Pri prekrivanju teh dveh kromatogramov se je večji del vrhov ujema (27). Zato sedaj kot izhodni material uporabljamo lubje navadne jelke.

Abigenol[®] je po dosedanjih preskušanjih eden od najmočnejših naravnih antioksidantov v pogojih *in vitro*. V okviru nadaljnjih raziskav o ugodnem delovanju Abigenola[®] nameravajo začeti še klinične študije, ki so ključne za nadaljnje registracijske postopke. Te študije bodo razjasnile tudi učinek Abigenola[®] v pogojih *in vivo*. Ponujajo se raziskave o možnem ugodnem vplivu tega sredstva na ožilje pri bolnikih s sladkorno boleznijo in revmatizmom. Če bodo rezultati ugodni, se tako odpira možnost za morebitno uvrstitev Abigenola[®] v kategorijo zdravil brez recepta (OTC), kar pa bi bil prvi primer registriranega antioksidanta iz skupine naravnih polifenolov na svetu (28).

2 NAMEN DELA

Lubje navadne jelke je lahko alternativni vir lubju obmorskega bora (Piknogenolu®). Namen našega dela bo okarakterizirati in poskusiti identificirati komponente ekstrakta lubja navadne jelke, ki so odgovorne za njegovo antioksidativno aktivnost in kakovost.

Pripravili bomo izvlečke jesenskega in dveh vzorcev različno starega posušenega spomladanskega lubja. Med seboj jih bomo primerjali po količini nastale oborine (izplenu Abigenola®) in po antioksidativni aktivnosti, ki jo bomo določili z DPPH metodo. Z njihovimi vodnimi in etilacetatnimi ekstrakti bomo posneli tudi HPLC kromatograme na analizni koloni. Nadaljnje analize bomo opravili z izvlečkom, ki se bo izkazal za najbolj kakovostnega.

Optimizirali bomo preparativno HPLC metodo in nato zbirali posamezne frakcije. Frakcije bomo skoncentrirali z odparevanjem mobilne faze pod znižanim tlakom na približno 1 mL. Tako pripravljene vzorce bomo ovrednotili z nekaterimi testi. Izvedli bomo TLC analizo z orositvenima reagentoma vanilin/HCl in za flavonoide s polietilenglikolom 4000 (NST/PEG), primerjali bomo antioksidativno aktivnost polifenolnih spojin z DPPH metodo, vsebnost polifenolnih spojin s Folin-Ciocalteau-jevo metodo, vsebnost proantocianidinov z vanilin/HCl metodo, primerjali bomo tudi HPLC kromatograme nekaterih standardov s HPLC kromatogrami Abigenola® z ali brez dodanih standardov. Na koncu bomo s frakcijami izvedli še tekočinsko kromatografijo z masno spektrometrijo (LC/MS).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Uporabljali smo lubje navadne jelke, ki je bilo nabrano maja 2010 v okolici Kočevske Reke (v nadaljnjem tekstu imenovano FFA lubje). Lubje je bilo ročno lupljeno in dva dni sušeno v kurilnici pri temperaturi približno 25° C. Pred pripravo ekstrakta je bilo posušeno lubje staro nekaj dni. Lubje, ki je bilo nabrano jeseni 2009, smo dobili od podjetja Tanin Sevnica d.d. Prav tako smo od omenjenega podjetja dobili tudi lubje, nabrano spomladi 2010. V primerjavi s FFA lubjem je bilo to lubje pred samo pripravo ekstrakta staro nekaj tednov. Lubje iz podjetja Tanin Sevnica d.d. je bilo v obeh primerih nabrano na Pohorju in tri dni sušeno pri temperaturi 40° C.

3.2 KEMIČALIJE

- Abigenol[®] po patentnem postopku, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo
- aceton (400971), Carlo Erba reagenti (Milano, Italija)
- acetonitril LICHROSOLV[®] za HPLC (100030), Merck (Darmstadt, Nemčija)
- 2-aminoetildifenilborinat (42810), Fluka (Buchs, Švica)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (D913-2), Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- elagna kislina (20954), Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Nemčija)
- (-)-epigalokatehingalat (324880), Calbiochem (Darmstadt, Nemčija)
- (-)-epikatehin (85523-5), Janssen Chimica (Beerse, Belgija)
- etanol, absolutni (4146072), Carlo Erba reagenti (Milano, Italija)
- etanol, 96 % (ALK133124), Kefo d.o.o. (Ljubljana, Slovenija)
- etilacetat (45760), Fluka (Buchs, Švica)
- ferulna kislina (F-3500), Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- Folin-Ciocalteu-jev fenolni reagent (47641), Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- galna kislina (48630), Fluka (Buchs, Švica)
- (+)-katehin (16370), Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Nemčija)
- klorovodikova kislina, 37 % (403871), Riedel-deHaën (Seelze, Nemčija)
- kvercetin dihidrat (83370), Fluka (Buchs, Švica)
- metanol (414816), Carlo Erba reagenti (Milano, Italija)

- mravljična kislina, 98-100 % (1.00264), Merck (Darmstadt, Nemčija)
- natrijev karbonat, brezvodni (71351), Fluka (Buchs, Švica)
- natrijev klorid (SO0225), Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Španija)
- natrijev sulfat, brezvodni (31481), Riedel-de Haën (Seelze, Nemčija)
- *n*-pentan (468151000), Merck (Darmstadt, Nemčija)
- *p*-hidroksibenzojska kislina (H-5376), Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- polietenglikol 4000 (33136), Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Nemčija)
- Pycnogenol[®], French Maritime pine bark extract (F0400), Biolandes (Le Sen, Francija)
- toluen (32249), Riedel-deHaën (Seelze, Nemčija)
- trifluoroocetna kislina (411561), Carlo Erba reagenti (Milano, Italija)
- vanilin (94750), Fluka (Buchs, Švica)
- voda LICHROSOLV[®] za HPLC (1.15333), Merck (Darmstadt, Nemčija)

3.3 APARATURE IN OPREMA

- analizna tehtnica ALS 120-4, Kern (Balingen, Nemčija)
- avtomatske pipete Biohit-Proline, Biohit (Helsinki, Finska)
- avtomatski nanašalec vzorca na TLC plošče Linomat IV, Camag (Muttenez, Švica)
- centrifuga Centric200R, Tehnica (Železniki, Slovenija)
- digestorij Variolab Mobilien W90, Waldner (Wangen, Nemčija)
- filter papir, Assistent (Sondheim, Nemčija)
- hladilnik, +5° C, Liebherr (Biberach an der 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 × 100 mm, 2,6 μm, Phenomenex (Torrance, Kalifornija, ZDA)
- HPLC preparativna kolona: Chromolith SemiPrep RP-18 endcapped 10 × 100 mm, Merck (Darmstadt, Nemčija)
- kamera za slikanje TLC plošč Reprostar 3, Camag (Muttenez, Švica)
- kuhalnik, Corona (Kranj, Slovenija)
- magnetno mešalo Rotamix SHP-10, Tehnica (Železniki, Slovenija)
- masni spektrometer Q-Tof Premier, Waters Micromass (Manchester, Velika Britanija)
- mikrotiterske plošče 96F, TPP (Trasadingen, Švica)

- mlinček Commercial Blendor HGB200, Waring (New Hartford, Connecticut, ZDA)
- nastavki za pipete, Saerstedt (Numbrecht, Nemčija)
- plošča za segrevanje TLC plošč Plate Heater III, Camag (Muttenez, Švica)
- programska oprema ChemBioDraw Ultra 11.0.1
- tehtnica XS205, Mettler (Greifensee, Švica)
- TLC plošče silikagel 60 F₂₅₄ (1.05729), Merck (Darmstadt, Nemčija)
- ultrazvočna kadička, Bandelin Sonorex digitect (Berlin, Nemčija)
- UPLC, Waters (Milford, USA)
- UV lučka UV-cabinet II, Camag (Muttenez, Švica)
- UV/VIS spektrometer Lambda Bio+, Perkin Elmer (Massachusetts, ZDA)
- UV/VIS spektrometer Safire 2, Tecan (Männedorf, Švica)
- vakuumski rotacijski uparjalnik Rotavapor R-200, Büchi (Flawil, Švica)
- zamrzovalnik, -25° C, Liebherr (Biberach an der Riss, Nemčija)

3.4 METODE

3.4.1 Izolacija polifenolnih spojin

Abigenol[®] ekstrakt smo pridobili po patentnem postopku za pridobivanje Abigenol[®] ekstrakta. Količino izhodnih surovin in topil smo prilagodili laboratorijskim razmeram.

3.4.2 Analizna in preparativna HPLC

Pri HPLC analizi smo uporabljali monolitno kolono. Izvajali smo reverzno fazno HPLC z gradientno elucijo. Kot mobilno fazo A smo uporabljali vodo z 0,1 % TFA (trifluoroocetne kisline), kot mobilno fazo B pa acetonitril z 0,1 % TFA. Pri optimizaciji preparativne metode smo spreminjali čas analize in pretok mobilnih faz.

Metoda analize HPLC

gradient: 0,01 min: 5 % B

1,00 min: 5 % B

10,00 min: 30 % B

10,01 min: 100 % B

12,00 min: 100 % B

12,01 min: 5 % B

15,00 min: 5 % B

pretok: 2 mL/min

čas metode: 15 min

valovna dolžina: 280 nm

injekcijski volumen: 20 µL

koncentracija vzorca (etilacetatni ekstrakti): 1 mg/mL

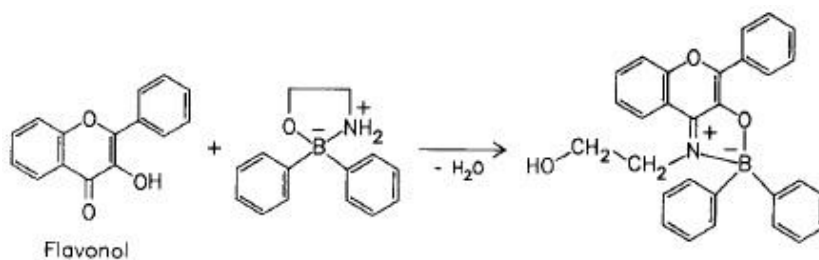
Z analizno metodo smo posneli kromatograme vodnih in etilacetatnih ekstraktov spomladanskega FFA lubja, jesenskega Tanin lubja in spomladanskega Tanin lubja.

3.4.3 TLC

Analizo TLC (tankoplastne kromatografije) smo izvajali na silikagelnih ploščah v nasičeni kadički z vertikalnim razvijanjem. Kot mobilno fazo smo uporabili toluen:aceton:mravljična kislina = 3:6:1. Razvite plošče smo orosili z orositvenima reagentoma vanilin/HCl in NST/PEG. Za tem smo pri testu z vanilinom ploščo za 1 minuto segrevali na plošči za segrevanje TLC plošč pri 100° C.

Po orositvi z **vanilinom** se vzorci vidijo kot oranžne do rdeče lise na beli podlagi. Obarvajo se proantocianidini, bodisi monomeri ali polimeri. S testom z vanilinom smo želeli pridobiti predhodne informacije o prisotnosti proantocianidinov v zbranih frakcijah. TLC na silikagelnih ploščah omogoča ločevanje oligomernih proantocianidinov vse do heptamerov. Lise, ki so potovale z mobilno fazo, pripadajo proantocianidinom z majhno molsko maso. Lise, ki so ostale na startu, pa pripadajo hidrofilnim spojinam z visoko molsko maso. Metoda je podrobneje opisana v podpoglavju 3.4.6 (21).

»**Naturstoff**« (**NST**) oz. aminoetilni ester difenilborne kisline tvori komplekse s flavoni in flavonoli (slika 12). Produkt reakcije ima absorpcijski maksimum pri 366 nm.

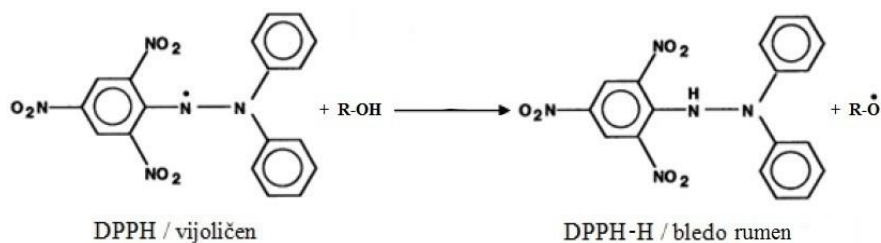


Slika 12: Potek reakcije med flavonolom in NST (31).

Po orositvi lise flavonov in flavonolov fluorescirajo v rumeni barvi. Polietilenglikol (PEG) izboljša občutljivost metode. Pozitivno reakcijo lahko dajo tudi antocianidini, fenolne kisline (npr. hidroksicimetna, metoksicimetna kislina), ogljikohidrati (npr. glukoza, fruktoza, laktoza), hipericin in penicilinska kislina. Ti običajno fluorescirajo v drugih barvah (10, 29, 30, 31).

3.4.4 DPPH metoda za določanje antioksidativne aktivnosti polifenolnih spojin

Molekula 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila je v obliki stabilnega radikala. Prosti elektron je delokaliziran po celotni molekuli, kar omogoča njeno stabilnost (molekula tako ne dimerizira, kot se zgodi pri večini ostalih radikalov), daje pa ji tudi intenzivno vijolično barvo z absorpcijskim maksimumom pri valovni dolžini okoli 520 nm. Ko raztopini DPPH dodamo antioksidant, ki je donor vodikovega atoma, pride do nastanka reducirane oblike molekule in zaradi tega do razbarvanja raztopine (bledo rumene barve). Reakcijo zaznamo s padcem absorbance. Pri reakciji (slika 13) se torej DPPH reducira do 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina, iz molekule antioksidanta pa nastane nov radikal, ki v naslednji stopnji reagira z novo molekulo DPPH.

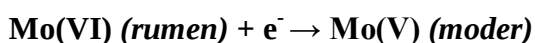


Slika 13: Reakcija DPPH radikala z antioksidantom (32).

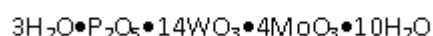
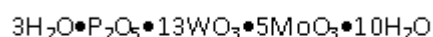
Stehiometrija je odvisna od števila vodikovih atomov, ki jih lahko donira antioksidant. Če lahko donira en vodikov atom gre za stehiometrijo 1:1, če dva pa 2:1, kar pomeni, da ena molekula antioksidanta reducira dve molekuli DPPH. Z DPPH reagirajo tudi glutation, aromatski amini (npr. *p*-fenilendiamin, *p*-aminofenol), α -tokoferol (vitamin E) in polihidroksi aromatske spojine (npr. hidrokinon, pirogalol). V primeru monohidroksi fenolov (npr. tirozin), enostavnih sladkorjev (npr. glukoza), purinov in pirimidinov reakcija ne poteče, proteini pa se oborijo. Reakcijo lahko motijo tudi nekateri anorganski ioni nizkih valenc (npr. Fe^{2+}) in jih je potrebno pred izvedbo reakcije odstraniti. Kadar uporabimo kot topilo vodo ali aceton lahko dobimo nižje vrednosti za obseg redukcije. DPPH metoda se lahko uporablja tako za trdne kot tekoče vzorce in ni specifična za posamezne antioksidativne fragmente na molekuli antioksidanta, pač pa se nanaša na celokupno antioksidativno sposobnost vzorca (32).

3.4.5 Folin-Ciocalteu-jeva metoda za določanje vsebnosti polifenolnih spojin

Folin-Ciocalteu-jev (FC) reagent je raztopina polimernega ionskega kompleksa iz fosfomolibdenskih in fosfovolframovih heteropolnih kislin (slika 14). Pri reakciji med fenolnimi spojinami in FC-jevim reagentom pride do oksidacije fenolatov, pri čemer zaradi redukcije heteropolnih kislin nastane moder kompleks oz. kromogen, ki ga detektiramo spektrofotometrijsko:



Produkt ima absorpcijski maksimum pri 765 nm. Ker so fenolati prisotni le v bazičnem mediju, FC-jev reagent in nastali



Slika 14: Folin-Ciocalteu-jev reagent (33).

produkti pa so v takih pogojih nestabilni, izvajamo reakcijo pri šibko bazičnih pogojih in z visoko koncentracijo reagenta. Slednji se lahko uporablja tudi kot orositveni reagent pri kromatografiji (33, 34, 35).

Pri dobljenih rezultatih moramo upoštevati, da s FC-jevim reagentom lahko reagirajo tudi vse polifenolne spojine (tudi tiste, ki morda niso odgovorne za antioksidativno aktivnost), nefenolne organske reducirajoče spojine in anorganske reducirajoče spojine. Tako dajo pozitivno reakcijo z reagentom tudi askorbinska kislina, sladkorji, organske kisline, proteini, aromatski amini, Fe^{2+} , hidrazin in še mnoge druge, do sedaj potrjene spojine. Če

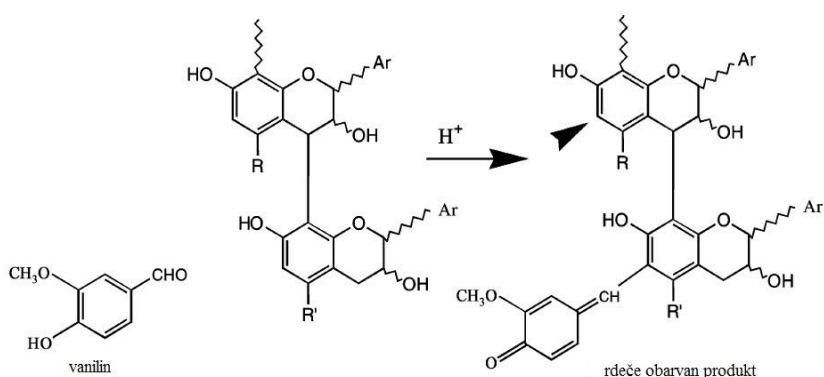
analizirani vzorci vsebujejo poleg polifenolnih spojin še naštete spojine, lahko s to metodo določimo večjo vsebnost skupnih polifenolnih spojin, kot jih vzorci dejansko vsebujejo (34, 35, 36, 37, 38).

Ta metoda potemtakem ni specifična za proantocianidine. S FC-jevim reagentom reagirajo vse reducirajoče spojine in dajo lažno povišane koncentracije polifenolov. Kljub temu, da test ni namenjen določanju antioksidativne aktivnosti pa je vsekakor koristen za odkrivanje antioksidantov. Mehanizem same reakcije je namreč oksidacijsko-redukcijski. Ker so polifenoli najpogostejši antioksidanti v večini rastlin, je ta test v večini primerov grob približek vsebnosti polifenolnih spojin. Ker ne vemo zagotovo, ali so v lubju jelke prisotni samo polifenoli, nam rezultat o celokupni vsebnosti polifenolnih spojin zaradi neselektivnosti FC-jevega reagenta ne zadošča. Zato moramo vzporedno določiti še dejansko antioksidativno aktivnost. Reakcije antioksidantov z DPPH radikalom so namreč drugačne od njihovih reakcij s FC-jevim reagentom. Kot že omenjeno, je FC-jev reagent občutljiv na veliko število spojin, ki se hitro oksidirajo, DPPH pa kaže različno stopnjo občutljivosti za različne antioksidante glede na njihovo kinetiko reakcije z DPPH. Tako nekateri fenolni antioksidanti, ki reagirajo močno s FC-jevim reagentom, ne reagirajo z DPPH (22, 36, 39, 40).

3.4.6 Vanilin/HCl metoda za določanje vsebnosti proantocianidinov

Vanilin je splošen reagent za dokazovanje fenolov. V primerjavi s FC-jevo metodo, kjer občutljivost variira, ima metoda z vanilinom boljšo občutljivost in je bolj specifična za določanje proantocianidinov. Primerna je za kvalitativno in kvantitativno določevanje flavan-3-olov, bodisi kot monomerov ali kot polimerov (10, 41, 42).

Karbonilna skupina, posebno pri aldehidih, tvori v močno kislih pogojih elektrofil, ki napade aromatsko jedro fenola in tvori produkt adicije. Kislina ima tako vlogo katalizatorja. Vanilinijev elektrofil v kislih pogojih reagira le na aktiviranih mestih benzenovega obroča. V primeru proantocianidinov reagira vanilin na mestu 6 ali 8 na obroču A, pri tem nastane intermediat, pri katerem z lahkoto poteče dehidracija do končnega produkta. Produkt je rdeče obarvan in ima absorpcijski maksimum med 480 in 550 nm (33). Potek reakcije prikazuje slika 15.



Slika 15: Potek reakcije med vanilinom in proantocianidinom. Puščica kaže na drugo potencialno reaktivno mesto (43).

Pri testiranju specifičnosti testa so ugotovili, da vanilin daje pozitivno reakcijo z več skupinami flavonoidov. Med njimi je razlika v intenzivnosti barve, ki se pri reakciji razvije. Pri polimerih flavan-3-olov z vanilinom reagirajo samo nekatere podenote in zato je donos barve na mol spojine lahko v primerjavi s katehinom nekoliko manjši. Povzetek reakcij nekaterih flavonoidov in kromonov z vanilinom prikazuje preglednica II (42, 43).

Za pozitivno reakcijo morajo biti izpolnjene določene zahteve:

- *Enojna vez med C-2-C-3*

Halkoni, flavoni, flavonoli in kromoni ne dajejo pozitivne reakcije ravno zaradi dvojne vezi na omenjenem mestu. Do inaktivacije verjetno pride zaradi delokalizacije elektronov, kar zmanjša elektronsko gostoto na obroču A.

- *Odsotnost karbonilne skupine na mestu C-4*

V primeru flavonov in flavonolov karbonilna skupina na mestu C-4 povzroči deaktivacijo obroča A, prav tako pa ne reagira obroč B, zato se reakcija uporablja kot specifični test za flavan-3-ole, saj le-ti nimajo karbonilne skupine na mestu C-4. Veliko manjša inaktivacija s karbonilno skupino je pri dihidrohalkonih. Ti so lahko aktivirani z dodatno prosto hidroksilno skupino na mestu C-6'. Glikozidi dihidrohalkonov na mestu C-2' dajo v primerjavi z aglikonom manjšo intenziteto barve, najbrž ker glikozilacija zmanjša elektronsko gostoto na C-2' ali ker glikozilna skupina sterično ovira substitucijo na mestu C-3'. Flavanoni in flavanonoli, ki sicer imajo v svoji strukturi enojno vez med C-2-C-3 pa dajejo z vanilinom, zaradi prisotne karbonilne skupine na mestu C-4, šibko reakcijo.

- *Prosta hidroksilna skupina na mestu C-7*

Flavanon glikozidi niso reagirali, kar kaže na zahtevo po prosti hidroksilni skupini na mestu C-7.

- *Proste meta-orientirane skupine v obroču B*

Preglednica II: Intenzivnost reakcije nekaterih flavonoidov in kromonov z vanilinom (42).

Lažno pozitivne rezultate lahko dajo tudi antocianini in klorofil. Fenolne kisline pa z vanilinom ne reagirajo. Antocianini lahko v kislih pogojih reagirajo z vanilinom. Produkt je obarvan rožnato-rdeče in ima prav tako absorpcijski maksimum med 480 in 550 nm. Da bi izključili lažno pozitivne rezultate, naredimo test s slepo raztopino, ki je HCl in etanol. Če se pojavi rdeča barva tako v kontrolni raztopini kot tudi v raztopini, kjer so dodani vsi reagenti, je vzrok obarvanja prisotnost antocianinov. V primeru proantocianidinov pa se kontrolna raztopina ne bo obarvala, raztopina z vsemi reagenti pa se bo (41, 42).

Skupina spojnin	Reakcija z vanilinom
Flavan-3-oli	+++
Dihidrohalkoni	+++
Glikozidi dihidrohalkonov	++
Halkoni	-
Flavanoni	+
Glikozidi flavanonov	-
Flavoni	-
Flavanonol	+
Flavonol	-
Kromoni	-

3.4.7 LC/MS

LC/MS je kompleksna naprava, ki sklaplja dve različni eksperimentalni tehniki, ki se medsebojno dopolnjujeta. Gre za kombinacijo kromatografskih in spektroskopskih metod, pri čemer izkoriščamo prednosti posameznih tehnik. LC del namreč omogoča učinkovito ločevanje komponent, MS pa njihovo detekcijo, tako da določi točno molekulo maso fragmentov spojin, ki jih na kromatogramu opazimo v obliki kromatografskih vrhov. Z molekulo maso spojine lahko le-to identificiramo. Uporabljali smo masni spektrometer Q-Tof Premier, ki sodi v generacijo visoko zmogljivih spektrometrov za raziskovalno in analitsko delo z organskimi spojinami in biomolekulami (44).

a) UHPLC (LC)

Pri analizi vzorcev smo uporabljali tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti (UHPLC oz. UPLC). Izvajali smo reverzno fazno UHPLC z gradientno elucijo. Kot mobilno fazo A smo uporabljali vodo z 0,1 % mravljične kisline, kot mobilno fazo B pa acetonitril.

Metoda UHPLC

gradient: 0,01 min: 5 % B

1,00 min: 10 % B

6,00 min: 30 % B

10,00 min: 100 % B

12,00 min: 5 % B

pretok: 0,2 mL/min

čas metode: 12 min

injekcijski volumen: 5 µL

b) MS

Kot vir ionizacije smo uporabili negativno (nastanejo anioni) in pozitivno (nastanejo kationi) ionizacijo z razprševanjem raztopin v električnem polju (ESI). Masni analizator je analizator na čas preleta ionov (Tof). Pogoji ionizacije so podani v preglednici III.

Preglednica III: Pogoji ionizacije.

Pogoji ionizacije	ESI+	ESI-
Napetost na kapilari (kV)	2,8	2,8
Napetost vhodne leče (V)	40	40
Temperatura izvora (° C)	150	150
Temperatura razpršilnega plina dušika (° C)	250	250
Pretok razpršilnega plina dušika (L/h)	530	528
Pretok plina dušika vhodne leče (L/h)	21	20

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 PRIPRAVA EKSTRAKTA LUBJA NAVADNE JELKE

Pripravili smo tri ekstrakte lubja navadne jelke:

- ekstrakt spomladanskega FFA lubja,
- ekstrakt spomladanskega Tanin lubja,
- ekstrakt jesenskega Tanin lubja.

Spomladansko FFA lubje (slika 16) smo zdrobili z mlinčkom do velikosti delcev, manjših od 3 mm. S tem smo olajšali nadaljnjo maceracijo in povečali njeno učinkovitost (večji donosi spojin iz droge). Natehtali smo 200 g zdrobljene droge in jo prelili z 2000 mL vrele prečiščene vode. Na kuhalniku smo drogo kuhali še 15 min. Nato smo izvedli filtracijo pod znižanim tlakom preko vate, da smo raztopino ločili od droge. Sledila je ekstrakcija z etilacetatom, ki smo jo ponovili trikrat. V vseh treh ponovitvah smo vsakokrat uporabili po 500 mL etilacetata, v katerem so se raztopili proantocianidini. Etilacetatni frakciji smo dodali sušilno sredstvo brezvodni natrijev sulfat in pustili mešati na magnetnem mešalu čez noč. Naslednji dan smo raztopino filtrirali in topilo odparevali pod znižanim tlakom pri temperaturi 50° C toliko časa, da je prišlo do zamotnitve. Ocenili smo približen volumen in dodali trikratno količino pentana. Nastala je oborina, ker je pentan (v primerjavi z etilacetatom, ki je srednje polarno topilo) nepolarno topilo. Pri tem so se oborili proantocianidini, ostale spojine pa so ostale raztopljene. Nato smo s filtracijo pod znižanim tlakom oborino ločili od raztopine, jo sprali še z majhno količino pentana in posušili do suhega.



Slika 16: Lubje FFA pomlad.



Slika 17: Lubje Tanin jesen.



Slika 18: Lubje Tanin pomlad.

Enak postopek smo uporabili za pripravo ekstraktov jesenskega in spomladanskega lubja iz Tanina (sliki 17 in 18) s to razliko, da smo pri slednjih dveh uporabili 100 g zdrobljene droge ter 1000 mL vrele prečiščene vode.

4.2 OPTIMIZACIJA PREPARATIVNE HPLC METODE

Pri preparativni HPLC analizi smo kot osnovo vzeli naslednjo metodo:

gradient: identičen metodi analize HPLC

pretok: 2 mL/min

čas metode: 15 min

valovna dolžina: 280 nm

injekcijski volumen: 50 µL

koncentracija vzorca: 100 mg/mL

Injicirali smo maksimalni volumen in koncentracijo vzorca, pri katerih teoretična kapaciteta kolone še ni presežena. Pri ponovitvi čim manj analiz smo tako lahko dobili dovolj veliko količino frakcije, ki smo jo lovili. Zaradi zmožnosti monolitne kolone smo povečevali pretok do 4 mL/min (3 mL/min, 4 mL/min). Pri optimizaciji metode smo spreminjali tudi čas analize, in sicer vse tja do 60 min (30 min, 40 min, 50 min, 60 min). Vedno smo spreminjali samo po eno spremenljivko. Tako smo razvili končno metodo, s katero smo dosegli najboljšo ločljivost: **pretok = 3 mL/min, čas metode = 60 min**, vsi ostali parametri pa so ostali nespremenjeni in so enaki osnovni metodi - le **gradient** smo ustrezno prilagodili daljši metodi:

0,01 min: 5 % B

1,00 min: 5 % B

50,00 min: 30 % B

50,01 min: 100 % B

55,00 min: 100 % B

55,01 min: 5 % B

60,00 min: 5 % B

Z optimizirano preparativno metodo smo posneli kromatograme naslednjih vzorcev:

- ekstrakta spomladanskega FFA lubja,
- ekstrakta spomladanskega FFA lubja z dodanimi standardi: katehin, epikatehin, galna kislina, *p*-hidroksibenzojska kislina,
- standardov: katehin, epikatehin, galna kislina, kvercetin dihidrat, ferulna kislina, (-)-epigalokatehingalat, *p*-hidroksibenzojska kislina.

Prav tako smo z isto metodo zbirali posamezne frakcije ekstrakta spomladanskega FFA lubja, ki smo jih označili s števili **od 1 do 39**. Pri zbiranju nam je instrument nekajkrat prekinil analizo, a smo na koncu uspeli zbrati frakcije iz približno dvajsetih analiz. Kot že omenjeno smo s preparativno kolono posneli tudi kromatograme standardov, saj smo tako lažje primerjali njihove kromatograme s kromatogramom ekstrakta spomladanskega FFA lubja.

4.3 TLC ANALIZA

Reagenta:

- *orositveni reagent vanilin/HCl*: pripravili smo 5 % raztopino vanilina v absolutnem etanolu in 10 % vodno raztopino HCl iz 37 % HCl.
- *orositveni reagent NST/PEG*: pripravili smo 1 % raztopino NST v metanolu in 5 % raztopino PEG 4000 v absolutnem etanolu.

Na silikagelno ploščo smo pri testu vanilin/HCl z avtomatskim nanašalnikom v črto nanесли raztopine ekstrakta spomladanskega FFA lubja jelke, standardov Piknogenol[®], katehin, epikatehin, (-)-epigalokatehingalat in zbranih frakcij. Pri testu z NST pa smo nanесли raztopine ekstrakta spomladanskega FFA lubja jelke, standardov Piknogenol[®] in kvercetin ter prav tako zbranih frakcij. Hitrost nanosa vzorca z avtomatskim nanašalnikom je bila 15 s/μL, volumen vzorca 15 μL, širina nanosa 8 mm in razmik med črtami 8 mm.

Po nanosu raztopin smo ploščo razvili v nasičeni kadički in po koncu razvijanja plošče orosili z orositvenima reagentoma. Pri testu z vanilinom smo ploščo najprej orosili s 5 % raztopino vanilina, šele nato pa z 10 % raztopino HCl. Za tem smo ploščo za 1 minuto segrevali na plošči za segrevanje TLC plošč pri 100° C. Pojavile so se oranžne do rdeče lise na beli podlagi. Pri drugem izvedenem testu pa smo ploščo najprej orosili z 1 % raztopino NST, nato pa še s 5 % raztopino PEG. Za tem smo pod UV lučko pri 366 nm pogledali fluorescenco. Lise lahko fluorescirajo takoj ali šele po 15 min, zato smo plošče pregledali takoj in po 15 min.

4.4 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI POLIFENOLNIH SPOJIN Z DPPH METODO

Antioksidativno aktivnost polifenolnih spojin smo določali spektrometrijsko. Med seboj smo sprva po antioksidativni aktivnosti primerjali ekstrakte spomladanskega FFA lubja, spomladanskega in jesenskega Tanin lubja ter kasneje še posamezne frakcije.

DPPH reagent: v 100 mL merilno bučko smo zatehtali 4,0 mg DPPH in dopolnili z metanolom do oznake.

Osnovne raztopine:

- *ekstrakt spomladanskega FFA lubja:* 15 mg ekstrakta lubja smo zatehtali v 100 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.
- *ekstrakta jesenskega in spomladanskega Tanin lubja:* 7,5 mg ekstrakta lubja smo zatehtali v 50 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Določanje antioksidativne aktivnosti:

- *ekstraktov spomladanskega FFA, jesenskega in spomladanskega Tanin lubja:*

180 μ L osnovne raztopine ekstrakta lubja jelke smo dodali 4,5 mL DPPH reagenta. Za slepo meritev smo k 180 μ L prečiščene vode dodali 4,5 mL DPPH reagenta.

- *frakcij ekstrakta spomladanskega FFA lubja in standarda epikatehina:*

Analizo frakcij in epikatehina smo izvajali v mikrotitrskih ploščah. V vdolbinice smo odpipetirali po 45 μ L prečiščene vode. V vsako od njih smo nato s pipeto dodali še 5 μ L posameznih zbranih frakcij in v eno vdolbinico še standard epikatehin, ki je bil pripravljen v koncentraciji 5 mg/mL. 2,4 μ L tako pripravljenega vzorca smo odpipetirali v drugo mitrotitrsko ploščo in s pipeto dodali v vsako vdolbinico še 200 μ L DPPH reagenta. Za slepo meritev smo si pripravili v eno od vdolbinic 2,4 μ L prečiščene vode in 200 μ L DPPH reagenta.

Absorbanco smo izmerili 30 minut po dodatku raztopine DPPH pri valovni dolžini 517 nm. Kalibracijo spektrometra smo opravili z metanolom. Rezultate smo podali kot % redukcije DPPH (Q) reagenta. Antioksidativno aktivnost frakcij smo izrazili glede na epikatehin. Q smo izračunali za posamezne frakcije po enačbi 1, za posamezne ekstrakte pa po enačbi 2.

$$Q = 100 \times \frac{(A \text{ slepa} - A \text{ vzorec})}{(A \text{ slepa} - A \text{ epikatehin})}$$

Enačba 1: % redukcije DPPH za posamezne frakcije.

$$Q = 100 \times \frac{(A \text{ slepa} - A \text{ vzorec})}{(A \text{ slepa})}$$

Enačba 2: % redukcije DPPH za posamezne ekstrakte.

4.5 ANALIZA VSEBNOSTI POLIFENOLNIH SPOJIN IN PROANTOCIANIDINOV

Vsebnost polifenolov in proantocianidinov smo določali spektrometrijsko. Kot standard smo uporabili epikatehin, med seboj pa smo po vsebnosti primerjali posamezne frakcije.

Reagenti:

- FC reagent,
- 20 % raztopina natrijevega karbonata v prečiščeni vodi,
- 4 % raztopina vanilina v 96 % etanolu,
- 32 % HCl, pripravljena iz 37 % HCl.

Standardna raztopina epikatehina:

5 mg epikatehina smo zatehtali v plastično 1,5 mL Eppendorf epruveto in s pipeto dodali 1 mL prečiščene vode. Raztopino smo petdesetkrat redčili. 20 µL te raztopine smo prenesli v drugo plastično 1,5 mL Eppendorf epruveto in s pipeto dodali še 980 µL prečiščene vode.

Analiza vsebnosti:

Ustrezen volumen vzorčne raztopine, t.j. posameznih frakcij ekstrakta spomladanskega FFA lubja, smo odpipetirali v mikrotitrsko ploščico in mu dodali reagente v predpisanih volumnih. Frakcije smo redčili pri obeh analizah. Pri analizi vsebnosti polifenolov smo k 10 µL posamezne frakcije dodali še 10 µL prečiščene vode, pri analizi vsebnosti proantocianidinov pa smo k 20 µL posamezne frakcije dodali 30 µL prečiščene vode. Po določenem času smo pri predpisani valovni dolžini izmerili absorbanco. Vzporedno z vzorčno raztopino smo analizirali tudi raztopino standarda epikatehina in slepi vzorec. Preglednica IV prikazuje reagente in njihove volumne, ki smo jih uporabili, po kolikšnem

času in pri kateri valovni dolžini smo merili absorbanco ter katero standardno raztopino smo uporabili.

Preglednica IV: Prikaz pogojev in reagentov za analizo polifenolov in proantocianidinov.

	POLIFENOLI	PROANTOCIANIDINI
V vzorčne razt. / μL	20	50
Reagenti pri vzorčni raztopini	150 μL voda 10 μL FC reagent 20 μL Na_2CO_3 (po 3 min)	100 μL vanilin 50 μL 32 % HCl
Reagenti pri slepi raztopini	160 μL voda 20 μL Na_2CO_3 (po 3 min)	100 μL 96 % EtOH 50 μL 32 % HCl
Standardna raztopina (0,1 mg/mL)	epikatehin	epikatehin
Merjenje A po / min	60	60
λ / nm	750	500

Iz razmerja absorbanc za epikatehin in posamezne frakcije smo izračunali koncentracijo polifenolov (PF) in proantocianidinov (PA) v mg/mL v posamezni frakciji izraženo kot epikatehin (enačbi 4 in 5). Absorbance smo dobili tako, da smo od absorbance vzorčnih in standardnih raztopin odšteli absorbance slepih raztopin. Pri izračunu smo upoštevali še redčitev.

$$\frac{A(\text{frakcija})}{A(\text{epikatehin})} = \frac{c(\text{frakcija})}{c(\text{epikatehin})} \rightarrow c(\text{frakcija}) = \frac{A(\text{frakcija}) \times c(\text{epikatehin})}{A(\text{epikatehin})}$$

Enačba 3

$$c(\text{PF v frakciji}) = \frac{A(\text{frakcija}) \times c(\text{epikatehin})}{A(\text{epikatehin})} \times 2$$

Enačba 4: Koncentracija polifenolov (mg/mL) v posamezni frakciji.

$$c(\text{PA v frakciji}) = \frac{A(\text{frakcija}) \times c(\text{epikatehin})}{A(\text{epikatehin})} \times \frac{5}{2}$$

Enačba 5: Koncentracija proantocianidinov (mg/mL) v posamezni frakciji.

4.6 LC/MS

Z metodo LC/MS smo posneli kromatograme in masne spektre nekaterih zbranih frakcij (1-21, 23, 25, 28) in standardov (katehin, epikatehin, (-)-epigalokatehingalat, kvercetin dihidrat, ferulna kislina, galna kislina, *p*-hidroksibenzojska kislina, elagna kislina). Pred injiciranjem samih frakcij nismo redčili. Koncentracija standardov je bila 0,8 mg/mL. Masne spektre smo analizirali in jih tudi primerjali z literaturnimi podatki. Pri identifikaciji spojin so nam bili v pomoč že poprej izvedeni testi.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 PRIPRAVA EKSTRAKTA LUBJA NAVADNE JELKE

Pripravili smo torej tri ekstrakte lubja navadne jelke. V preglednici V so prikazane mase suhih ekstraktov in izkoristki izolacije iz posameznih lubij.

Preglednica V: Mase suhih ekstraktov in izkoristki izolacije iz posameznih lubij.

Ekstrakt	FFA pomlad (200 g)	Tanin jesen (100 g)	Tanin pomlad (100 g)
Masa suhega ekstrakta	1002 mg	61,9 mg	284,6 mg
Izkoristek izolacije	0,501 %	0,062 %	0,285 %

Sam postopek izolacije se pri posameznih vzorcih lubja ni razlikoval, ampak je tekom izolacije prišlo do nekaterih sprememb. Pri ekstrakciji z etilacetatom je nastala trdovratna emulzija (slika 19). Le-to smo lahko pri spomladanskem lubju s segrevanjem z vročim zrakom in dodajanjem natrijevega klorida uspešno ločili. Pri spomladanskem Tanin lubju smo to dosegli že samo s segrevanjem, pri FFA lubju pa smo morali dodati še natrijev klorid. V primeru jesenskega lubja pa tak način ločevanja ni bil najbolj uspešen. Po koncu druge ekstrakcije nismo mogli emulzije ločiti niti z dodatkom natrijevega klorida niti s segrevanjem. Zaradi otežene izolacije so bile tudi izgube večje in temu primerno manjši izkoristek. Na nastanek emulzije pri ekstrakciji najverjetneje vplivajo ioni smol. Navadna jelka ima v lubju veliko smole. Čeprav smo pri maceraciji uporabljali vodo, ki kot polarno topilo preprečuje, da bi v ekstraktu dobili bolj nepolarne snovi, kot so smola in lipidi, pa se kot kaže določen delež teh komponent vseeno ekstrahira v manjši količini. Zato bi bilo morda smiselno, da bi pred ekstrakcijo z etilacetom naredili še ekstrakcijo z bolj nepolarnim topilom (npr. z diklorometanom ali petroletrom). V tem primeru bi imeli manj težav zaradi nastajanja emulzije pri nadaljnji ekstrakciji z etilacetatom in tako tudi manjše izgube iskanih spojin. Možno je tudi, da nam preglavice povzroča nedavno



Slika 19: Nastanek emulzije tekom ekstrakcije.

odkrita spojina v lubju jelke, t.j. desmetilabietospiran, ki deluje kot tvorilec gela.

Pri jesenskem lubju je po dodatku pentana nastala gumijasta oborina. Zaradi otežene ekstrakcije so bili v oborini najverjetneje še vedno prisotni sledovi vlage. Z odparevanjem na rotavaporju smo se te vode znebili. Proantocianidine iz jesenskega lubja smo očistili s ponovnim raztapljanjem v etilacetatu, ki mu je sledilo ponovno obarjanje v pentanu.

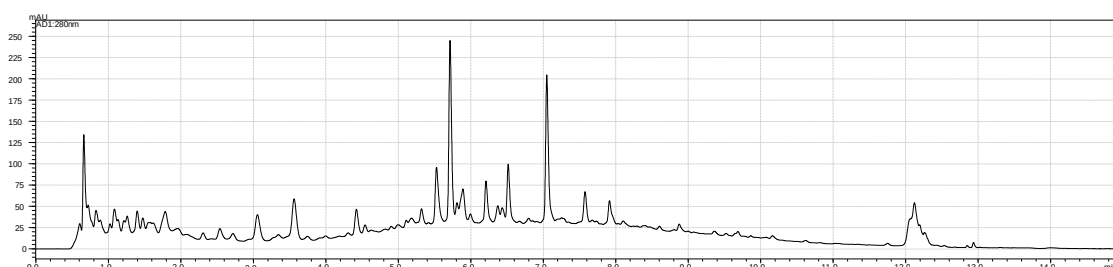
Sklepamo lahko, da je tekom shranjevanja lubja prišlo do oksidacije spojin, zato je tudi izkoristek izolacije pri spomladanskem in jesenskem Tanin lubju manjši. Ali pa je pri staranju lubja prišlo do sprememb v njegovi sestavi, najverjetneje do polimerizacije nekaterih komponent, ki so ostale v vodni fazi. Za pridobivanje proantocianidinov iz lubja jelke je torej smiselno uporabljati čim bolj sveže spomladansko lubje. Tudi pri analizi antioksidativne aktivnosti (podpoglavje 5.4) se je ekstrakt spomladanskega FFA lubja izkazal za najbolj kakovostnega, zato smo pri vseh nadaljnjih analizah uporabljali le-tega.

Z etilacetatom lahko ekstrahiramo monomere in oligomere proantocianidinov do stopnje polimerizacije približno 4. Višji oligomeri in polimeri so bolj topni v vodi, zato ostanejo v vodni fazi. V etilacetatno fazo preidejo tudi acilirani antocianini in flavonoli, aglikoni flavonolov, fenolne kisline ter elagna kislina in njeni glikozidi. Antocianini so praktično netopni v etilacetatu in zato ostanejo v vodni fazi (39). Ti literaturni podatki so nam pomagali pri nadaljnji identifikaciji spojin.

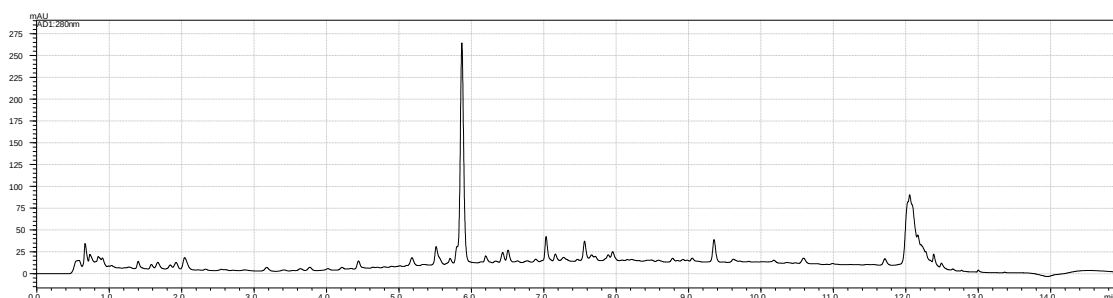
5.2 HPLC ANALIZA

HPLC analizo smo naredili z namenom pridobivanja primerjalnih kromatogramov med našimi vzorci in nekaterih informacij, ki bi nam bile v pomoč pri določanju strukture spojin. Najprej smo na analizni koloni z že opisano metodo v podpoglavju 3.4.2 posneli kromatograme vodnih ekstraktov (slike 20, 21 in 22). Pri prekrivanju le-teh so se med njimi pokazale nekatere razlike. Na reverzno fazni stacionarni fazi vrstni red elucije proantocianidinov ni povezan z njihovo stopnjo polimerizacije. Na normalno fazni stacionarni fazi se namreč proantocianidini eluirajo v zaporedju glede na naraščajočo stopnjo polimerizacije in tako imajo monomeri najkrajši retencijski čas. Na reverzno fazni HPLC dosežemo dobro ločitev med izomeri monomerov, izomeri dimerov in izomeri trimerov proantocianidinov. Pri višjih oligomerih pa to ni več izvedljivo, ker se z višanjem stopnje polimerizacije poveča tudi število izomerov. To povzroči, da pride do prekrivanja

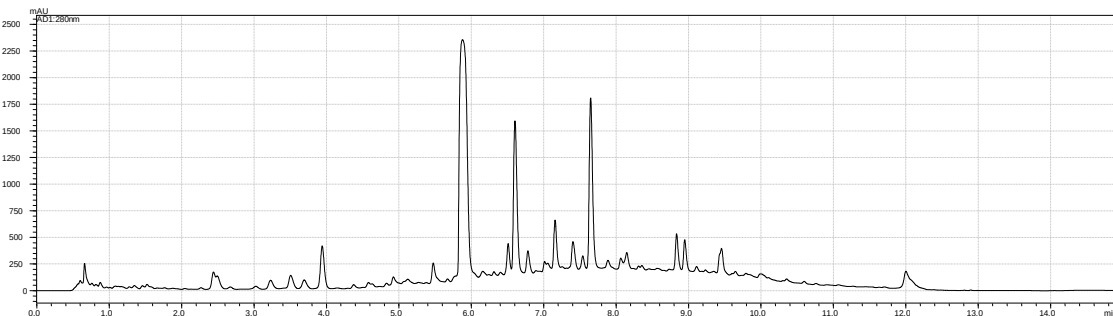
izomerov z različno stopnjo polimerizacije. Zato se višji oligomeri koeluirajo in dajo širok nerazrešen vrh (21). Če primerjamo med seboj vodne ekstrakte FFA pomlad, Tanin pomlad in jesen, opazimo, da so pri zadnjih dveh tudi manjše površine vrhov. Tako lahko potrdimo že prej navedeno domnevo, da je najverjetneje tekom shranjevanja lubja prišlo do oksidacije spojin. Z vodnimi ekstrakti lubja jelke so tekom raziskovalnega dela na fakulteti že nekajkrat izvedli DPPH metodo. Vodni ekstrakt je zmeraj kazal boljšo antioksidativno aktivnost kot etilacetatni ekstrakt. Najverjetneje vsebuje višje oligomere in polimere, ki so močnejši antioksidanti v primerjavi z monomeri in nižjimi oligomeri proantocianidinov (podpoglavje 1.3.2). Vodni ekstrakt Tanin jesen ima v primerjavi z ostalima dvema kromatogramoma intenzivnejši vrh pri 12,1 minuti.



Slika 20: Kromatogram vodnega ekstrakta FFA pomlad.



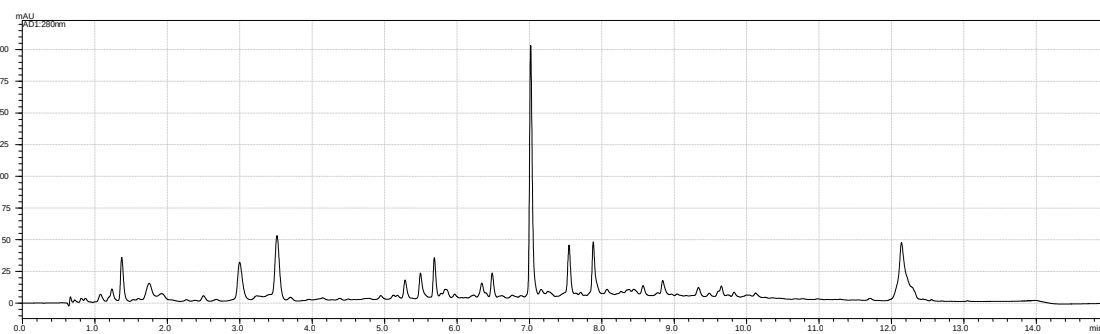
Slika 21: Kromatogram vodnega ekstrakta Tanin jesen.



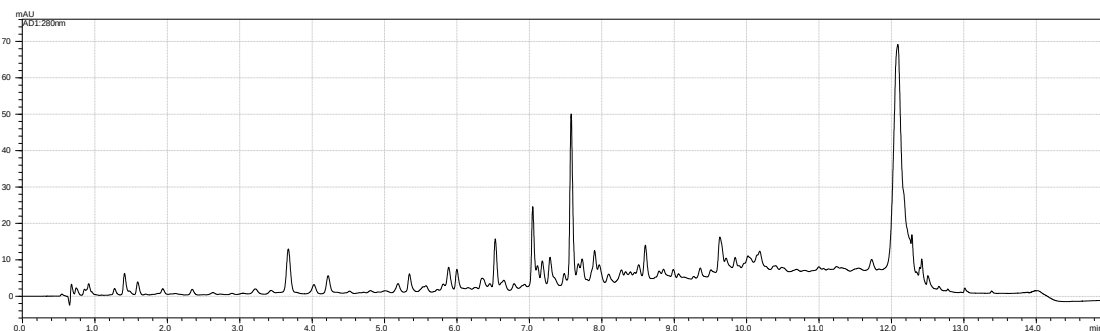
Slika 22: Kromatogram vodnega ekstrakta Tanin pomlad.

V primerjavi z vodnimi ekstrakti imajo etilacetatni ekstrakti na samem začetku kromatograma manjše površine vrhov (slike 23, 24 in 25). Najverjetneje so višji oligomeri

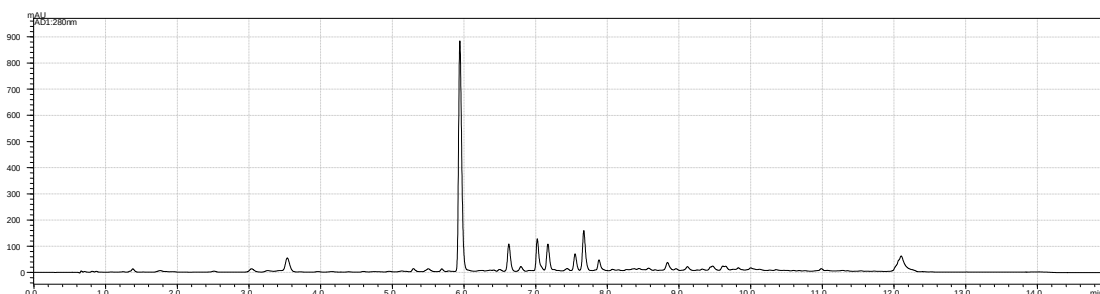
(od pentamerov naprej) in polimeri med ekstrakcijo ostali v vodni fazi. V etilacetatni fazi pa lahko pričakujemo monomere, dimere, trimere in morebiti tetramere. Ekstrakcija je bila tako učinkovita. Do polimerizacije komponent najbrž tekom staranja lubja ni prišlo, saj opazimo pri vodnih ekstraktih Tanin pomlad in jesen zelo male površine vrhov fronte. Pri ekstraktu Tanin jesen lahko ponovno opazimo intenziven vrh pri 12,1 minuti. To bi lahko bila spojina, ki nam tekom ekstrakcije z nastankom emulzije povzroča preglavice. Vendar frakcije tega vrha na žalost nismo zbirali in spojine tako nismo mogli identificirati. Pri prekrivanju kromatogramov spomladanskih ekstraktov se večji del vrhov ujema, medtem ko njuno prekrivanje z jesenskim ekstraktom ne da praktično nobene podobnosti. Jesensko lubje kaže drugačen HPLC profil. Lubje Tanin pomlad ima manjše površine pod krivuljo v primerjavi s FFA pomlad, kar bi lahko obrazložili z oksidacijo spojin.



Slika 23: Kromatogram etilacetatnega ekstrakta FFA pomlad.

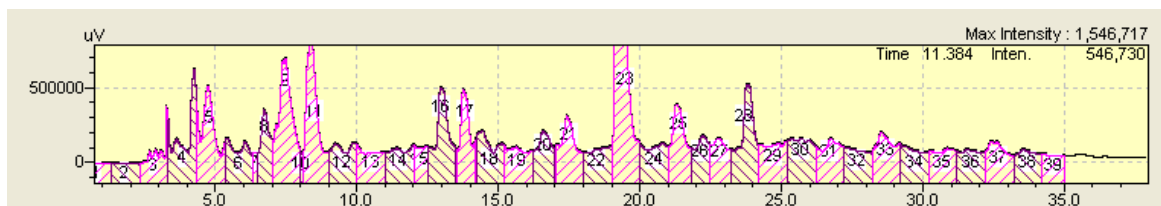


Slika 24: Kromatogram etilacetatnega ekstrakta Tanin jesen.



Slika 25: Kromatogram etilacetatnega ekstrakta Tanin pomlad.

Pri zbiranju frakcij na preparativni koloni je bila ponovljivost metode dobra. Kljub temu je pri nekaterih zbiranjih prišlo do časovnega zamika. Zato ni izključujoče, da je bila določena frakcija kontaminirana s predhodno frakcijo. Primer: frakcija 16 je lahko bila kontaminirana s frakcijo 15. Na sliki 26 so označene posamezne frakcije vrhov, ki smo jih zbirali in jih nato skoncentrirali z odparevanjem topila pod znižanim tlakom na približno 1 mL.

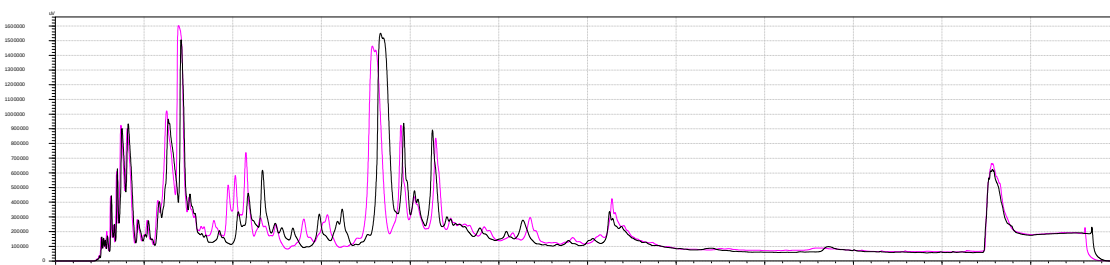


Slika 26: Zbiranje frakcij ekstrakta spomladanskega FFA lubja.

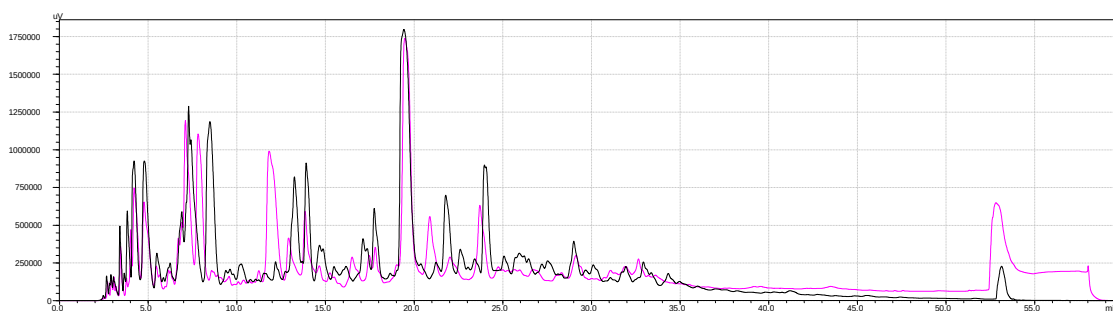
Želeli smo preveriti ali tudi ekstrakt spomladanskega FFA lubja jelke vsebuje enake spojine, ki izkazujejo antioksidativno aktivnost kot ekstrakt lubja obmorskega bora. V ta namen smo z nekaterimi standardi posneli HPLC kromatograme. Z enimi od teh smo izvedli tudi metodo standardnega dodatka. Pri tem se je po dodatku standarda povečal odziv vrha zaradi dodatka tega standarda (preglednica VI, sliki 27 in 28). Iz posnetih kromatogramov smo lahko sklepali, da je katehin prisoten v frakciji 11, epikatehin pa morda v frakciji 15 ali 16.

Preglednica VI: Retencijski časi (t_R) posameznih standardov.

Spojina	t_R (min)
katehin	8,2
epikatehin	12,5
(-)-epigalokatehingalat	12,0
galna kislina	3,0
kvercetin dihidrat	7,4
ferulna kislina	17,4
<i>p</i> -hidroksibenzojska kislina	6,6



Slika 27: Primerjava Abigenola® (črna krivulja) in standarda katehina z Abigenolom® (rdeča krivulja).



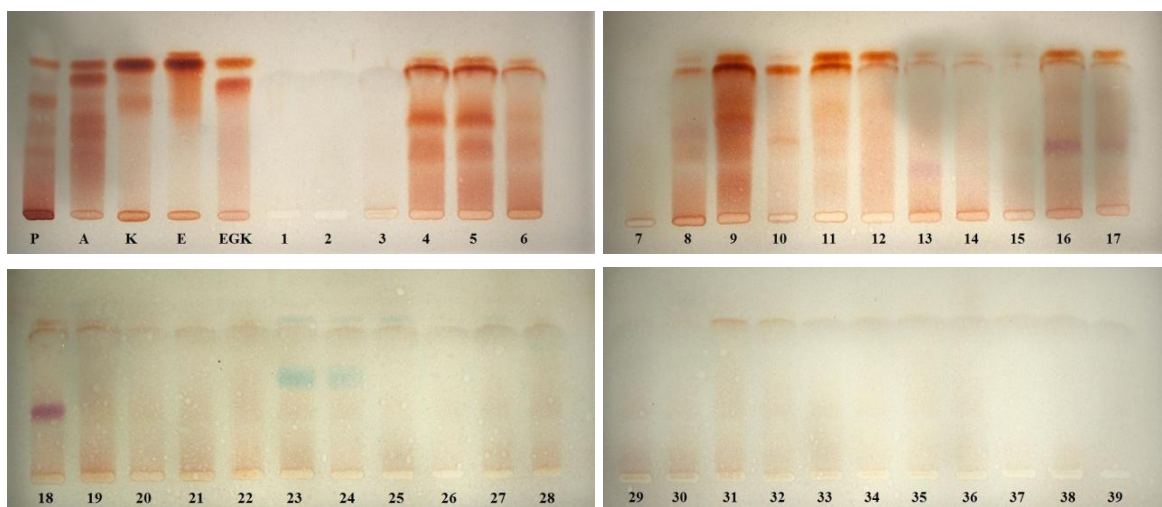
Slika 28: Primerjava Abigenola[®] (črna krivulja) in standarda epikatehina z Abigenolom[®] (rdeča krivulja).

Na neko spojino smo sklepali po tem, da se je retencijski čas določene spojine ujema z retencijskim časom standarda. Vendar je to samo deloma zanesljivo. Ne moremo z gotovostjo zatrditi, da je vrh, ki po času sicer ustreza standardu, res identičen uporabljenemu standardu. Vrsta spojin ima namreč skoraj enake čase zadrževanja na isti koloni. Zraven tega nekateri standardi niso komercialno dostopni. Za potrditev neke spojine potrebujemo strukturne podatke, te pa najlažje dobimo s spektroskopskimi metodami. Na žalost je UV-VIS spekter določene substance premalo specifičen, ker so si posamezni spektri med seboj precej podobni, še zlasti pri homologih. Tako je npr. detekcija posameznih procianidinov nemogoča, ker dobimo podobne oblike in maksimume UV spektrov. Flavan-3-oli imajo absorpcijski maksimum med 270 in 290 nm, med temi procianidini pri 280 nm. Tu pa absorbira tudi veliko fenolov. Flavan-3-oli imajo tudi manjšo UV ekstinkcijo (absorbanco) kot fenoli, slednji pa so lahko prisotni tudi v večjih količinah. Detekcija pri teh valovnih dolžinah tako ne dopušča selektivne detekcije. Za identifikacijo spojin se najpogosteje uporablja povezava LC-MS, katero smo v nadaljevanju izvedli tudi mi (39).

5.3 TLC ANALIZA

Pri ploščah, orošenih z reagentom vanilin/HCl, so se pojavile oranžne do rdeče lise (slika 29). Pri standardu Pkynogenolu[®] je ena od teh ostala na startu. Po literaturnih podatkih se pri TLC na silikagelu ločijo proantocianidini od monomerov do heptamerov. Višji oligomeri in polimeri pa ne potujejo z mobilno fazo, ampak ostanejo na startu. Pri opisani TLC metodi so na startu ostali že heptameri (21). Slednja ugotovitev je v skladu z literaturnimi podatki, ki opisujejo sestavo ekstrakta lubja obmorskega bora (podpoglavje

1.4). Ti navajajo tudi prisotnost katehina in epikatehina. Tudi na naši plošči se lisa Pkknogenola[®], ki je z mobilno fazo pripotovala najdlje, ujema z lisama standarda katehina in epikatehina. Ta dva se na TLC plošči po retardacijskem faktorju ne razlikujeta (na normalno fazni stacionarni fazi se izomere ne ločijo), le da je pri epikatehinu na vrhu vidna še manjša dodatna lisa. Standardi so tekom shranjevanja že najbrž razpadli ali pa je sam postopek njihovega pridobivanja tak, da vsebujejo še nekaj stranskih produktov reakcije. Tudi pri HPLC analizi smo pri vsakem od injiciranih standardov na kromatogramu zasledili dva vrhova.



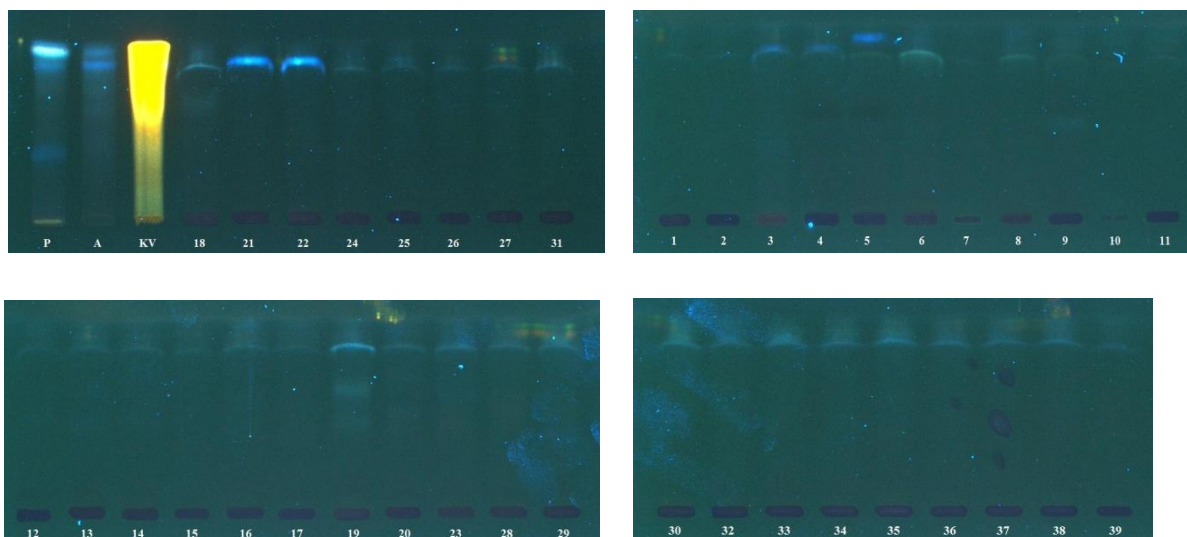
Slika 29: TLC plošče orošene z orositvenim reagentom vanilin/HCl (P = Pkknogenol[®], A = Abigenol[®], K = Katehin, E = Epikatehin, EGK = (-)-Epigalokatehin galat, 1-39 = Frakcije 1-39).

Pri Abigenolu[®] in posameznih frakcijah nobena od lis ni ostala na startu. Tako lahko že iz TLC analize sklepamo, da v ekstraktu ni oligomernih proantocianidinov, višjih od heptamerov. Možno je tudi, da so prisotni v manjših količinah in jih zato s kvalitativno analizo nismo zaznali. Lisa, ki je pripotovala z mobilno fazo najdlje, se ujema z lisama standarda katehina in epikatehina. Kot smo že pri HPLC analizi določili prisotnost katehina in epikatehina, smo njuno prisotnost v naših vzorcih potrdili tudi s TLC. To liso lahko zasledimo v večini frakcij. Najverjetneje smo presegli kapaciteto kolone in zato sta se katehin in epikatehin eluirala tudi v te frakcije. Pri tem moramo upoštevati tudi možno kontaminacijo frakcij tekom njihovega zbiranja na preparativni koloni. Pri frakcijah 1, 2, 3, 7, 29, 30, 33-39 se ni obarvala nobena izmed lis. To pomeni, da v njih ni flavan-3-olov ali pa da niso prisotni v večjih količinah. V frakcijah 4, 5, 6, 8-19 se je po orositvi obarvalo več lis. V vsaki od teh frakcij sta prisotni najmanj dve spojini, ki jih s HPLC analizo med

seboj nismo uspeli ločiti ali pa je bila presežena kapaciteta kolone. Možen vzrok je lahko tudi sama kontaminacija frakcij tekom njihovega zbiranja.

Pri analizi TLC plošč ne smemo pozabiti na možne lažno pozitivne rezultate. Tako ni nujno, da oranžne-rdeče lise pripadajo flavan-3-olom. Ne smemo izključiti prisotnosti antocianinov, dihidrohalkonov, glikozidov dihidrohalkonov, klorofila, flavanonov in flavanonolov. Po orositvi z orositvenim reagentom so se v frakcijah 8, 9, 13, 16, 17, 18, 23, 24 in 25 pojavile tudi modre in vijoličaste lise. Po literaturnih podatkih bi se naj tako obarvali saponini (45).

Pri plošči, orošeni z NST/PEG (slika 30), je lisa standarda kvercetin dihidrata fluorescirala rumeno. Ostali nanešeni vzorci v tej barvi niso fluorescirali, kar pomeni, da v njih ni prisotnih flavonov in flavonolov ali da jih ni v večjih količinah. Piknogenol[®], Abigenol[®], frakcije 3, 4, 5, 9, 18, 19, 21 in 22 so fluorescirali modro. Po literaturnih podatkih tako fluorescirajo organske kisline ali pa ogljikohidrati - npr. glukoza, fruktoza, laktoza (31, 46). Glikozidi flavonoidov bi fluorescirali oranžno (47). Pri standardu Piknogenolu[®] so tri lise fluorescirale modro, kar ni presenetljivo, saj iz literaturnih podatkov vemo, da ekstrakt vsebuje tudi fenolne kisline. Prostih sladkorjev do sedaj še niso zasledili. Ker imata lisi standarda Piknogenola[®] in Abigenola[®] enak retardacijski faktor, bi lahko sklepali, da vsebujeta identične fenolne kisline. V frakciji 19 je več lis fluoresciralo modro, kar pomeni, da lahko frakcija vsebuje več organskih kislin ali sladkorjev.



Slika 30: TLC plošče orošene z orositvenim reagentom NST/PEG (P = Piknogenol[®], A = Abigenol[®], KV = Kvercetin dihidrat, 1-39 = Frakcije 1-39).

5.4 DOLOČANJE VSEBNOSTI POLIFENOLOV IN PROANTOCIANIDINOV TER ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI POLIFENOLNIH SPOJIN

Rezultati antioksidativne aktivnosti posameznih ekstraktov lubja navadne jelke so zbrani v preglednici VII.

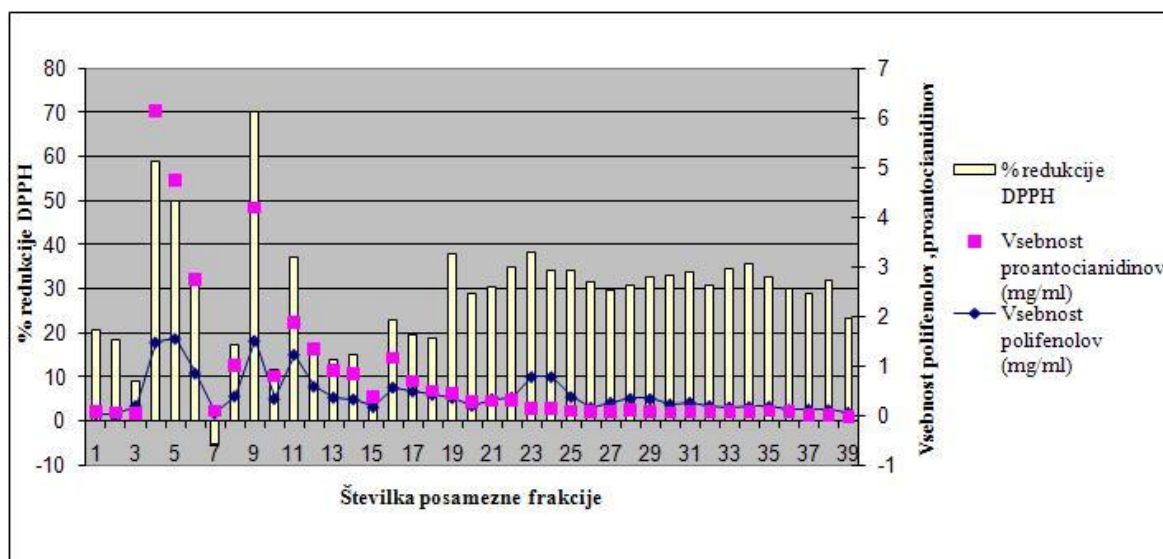
Preglednica VII: % redukcije DPPH (Q) ekstraktov lubja navadne jelke.

Ekstrakt	Q	Q glede na ekstrakt spomladanskega FFA lubja
FFA pomlad	52,0	100,0
Tanin jesen	16,1	34,0
Tanin pomlad	28,6	60,5

Ekstrakt spomladanskega Tanin lubja ima 0,61-kratno, ekstrakt jesenskega Tanin lubja pa 0,34-kratno antioksidativno aktivnost kot enaka masa ekstrakta spomladanskega FFA lubja. Tudi s pomočjo tega testa lahko sklepamo, da je tekom shranjevanja lubja prišlo do oksidacije spojin.

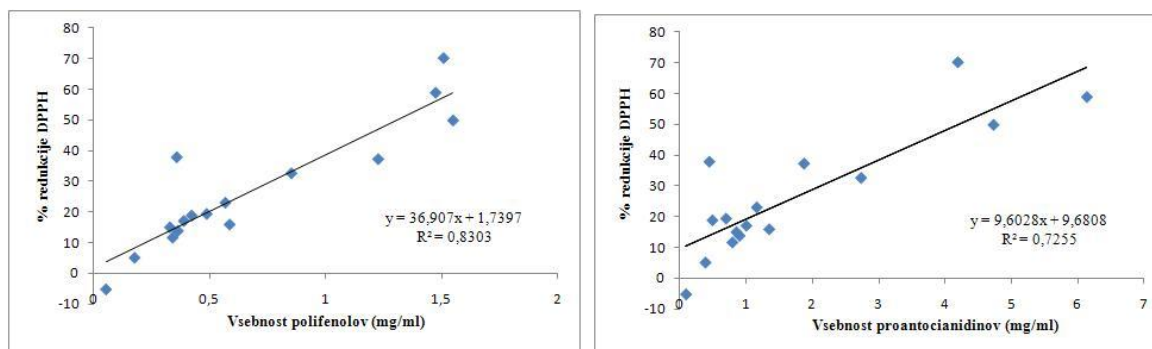
Na sliki 31 je prikazana vsebnost polifenolov, proantocianidinov in % redukcije DPPH v vsaki frakciji. Pri vseh izvedenih metodah smo rezultate izrazili glede na epikatehin, tako da smo jih lahko med seboj primerjali na enostaven način. Iz grafa opazimo, da so koncentracije polifenolov v posameznih frakcijah večinoma nižje od koncentracij proantocianidinov. To bi lahko obrazložili z boljšo občutljivostjo vanilin/HCl metode. Iz grafa lahko razberemo, da frakcije, ki vsebujejo sicer nizke koncentracije proantocianidinov/polifenolov, izkazujejo veliko antioksidativno aktivnost. Trdili bi lahko, da frakcija 9 vsebuje zelo močne antioksidante. Če pa pogledamo antioksidativno aktivnost na mg proantocianidinov/polifenolov pa vidimo, da temu ni več tako. Frakcije 25-39 prav tako kažejo kljub nizkim koncentracijam polifenolov/proantocianidinov veliko antioksidativno aktivnost. Ugotovili smo, da ima tudi mobilna faza kot topilo v frakcijah določeno antioksidativno aktivnost. Odstotek redukcije DPPH acetonitrila z dodano 0,1 % TFA (mobilna faza B) je bil 14,81. S tem ko smo morda presegli kapaciteto kolone so se najverjetneje nekatere spojine eluirale tudi v te frakcije. Najbrž med temi spojinami in še nekaterimi drugimi spojinami v frakcijah pride do sinergizma, kar je vzrok za veliko antioksidativno aktivnost. Pri TLC analizi se po orositvi z vanilinom v nekaterih od teh

frakcij lise zaradi nizkih koncentracij proantocianidinov niso obarvale. Frakcija št. 7 kaže prooksidativno aktivnost.



Slika 31: Vsebnost polifenolov, proantocianidinov in % redukcije DPPH v posameznih frakcijah.

Na naslednjih dveh grafih (slika 32) je prikazana odvisnost % redukcije DPPH od vsebnosti polifenolov oz. proantocianidinov v posameznih frakcijah. Visok korelacijski koeficient pri polifenolih nakazuje, da so za antioksidativno aktivnost ekstrakta odgovorne polifenolne spojine. Opazimo pa, da je večji koeficient korelacije pri polifenolih kot pri proantocianidinih. To pomeni, da antioksidativna aktivnost ekstrakta ni odvisna le od vsebnosti proantocianidinov, ampak tudi še od nekaterih drugih polifenolov.



Slika 32: Korelacija med antioksidativno aktivnostjo, določeno z DPPH metodo in vsebnostjo polifenolov (levo) oz. proantocianidinov (desno).

5.5 LC/MS

Vzorec (frakcije, standardi) smo najprej z UHPLC ločili na posamezne spojine, potem pa so te spojine potovale do vmesnika, analizatorja in detektorja. Z UHPLC smo dosegli boljšo ločitev med spojinami v posameznih frakcijah. S to metodo so se namreč ločile tudi spojine, ki se pri HPLC z monolitno kolono niso ločile. V primerjavi z UV detekcijo je MS veliko bolj specifična, občutljiva in hitrejša. Zaradi večje občutljivosti je za analizo potrebno manj vzorca.

Kot način ionizacije smo uporabili ESI, ki je enostavna metoda in s katero lahko ioniziramo polarne, termolabilne in nehlapne spojine kot so proantocianidini. Primarno smo za identifikacijo spojin uporabili negativno ESI, kjer nastanejo anioni. Za pridobivanje podatkov o fragmentaciji oz. cepitvi molekule na več manjših fragmentov smo izvedli pozitivno ESI, pri kateri nastanejo kationi. Fenolne spojine oz. proantocianidini se zaradi njihove šibko kisle narave lažje deprotonirajo kot protonirajo, pri čemer se tvori negativno nabit ion. V primeru pozitivne ESI je fenolna skupina sprejela proton in tvoril se je pozitivno nabit ion. Za identifikacijo proantocianidinov je bolje uporabiti negativno ESI zaradi manjšega števila fragmentov in ker se tukaj tvori več večkrat nabitih ionov; oboje da bolj enostaven masni spekter kot pa pozitivna ESI. Masni spekter, posnet s pozitivno ESI, je zelo kompleksen - bodisi zaradi kompleksnosti zmesi pri analizi ali pa zaradi možne ionizacije s kationi v raztopini (npr. z NH_4^+ , Na^+ , K^+). Tako se lahko zgodi, da je v negativni ESI molekulski vrh opazen, v pozitivni ESI pa ne. Molekulski vrh se namreč tukaj izgubi v ozadju. Ioni, ki so prisotni v spojnini vzorca, so v masnem spektru razdeljeni glede na razmerje masa proti naboju (m/z). Ker gre pri ESI za prenos nabojev na komponente vzorca, se pogosto zraven enkrat nabitih pojavljajo še večkrat nabiti delci, ki povečajo občutljivost metode. Spojine z veliko molekulsko maso, kot so proteini prioritetno tvorijo večkrat nabite ione. Tudi procianidini so z višanjem stopnje polimerizacije nagnjeni bolj k tvorbi večkrat nabitih ionov. Pozitivna ESI je uspešna pri odkrivanju enkrat nabitih ionov, t.j. $[\text{M}+\text{H}]^+$ vse do pentamerov, negativna ESI $[\text{M}-\text{H}]^-$ pa vse tja do oktameroev. Za odkrivanje oligomerov z višjo stopnjo polimerizacije in polimerov pa se morajo tvoriti večkrat nabiti ioni.

Posamezne spojine smo identificirali na osnovi retencijskih časov, molskih mas oz. m/z vrednostih spojin (molekulski ion) in njihovih značilnih fragmentov ter na osnovi bruto

formul molekulskega vrha in nekaterih fragmentov. Za proantocianidine so značilni naslednji načini fragmentacije: *retro Diels-Alderjeva reakcija*, *cepitev heterocikličnega obroča*, *tvorba benzofurana po cepitvi in cepitev kinon-metid*. ESI ne more ločiti med izomernimi spojinami (2,3 *cis/trans* enote, C-4-C-6/C-4-C-8 povezave, različna zaporedja enot). Masne spektre smo prvič posneli s frakcijami iz samo enega zbiranja na preparativni koloni. Iz teh frakcij tudi nismo odpareli topila oz. mobilne faze. Spektri so bili preveč kompleksni in njihova interpretacija je bila zelo zahtevna. Vzrok za to je bilo najverjetneje topilo, ki ga je bilo v primerjavi z iskano spojino veliko več. Topilo in nečistote v njem močno ovirajo analizo, saj tekmujejo s spojino za ionizacijo. S tem pa se zmanjša odziv masnega analizatorja za iskano spojino. Zato smo se odločili, da bomo preparativno kromatografijo ponovili večkrat in tako dobili večje količine spojin. Na koncu zbiranja smo posamezne frakcije z odparevanjem topila pod nižanim tlakom tudi skoncentrirali. Spektri, ki smo jih posneli s temi frakcijami, niso bili več tako kompleksni. Pri interpretaciji masnih spektrov smo se opirali tudi na zgoraj navedene literaturne podatke (39, 44, 48).

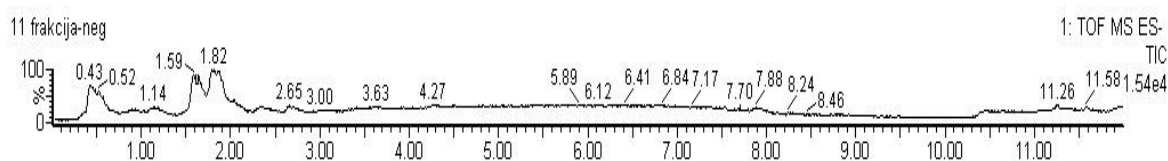
Sprva smo injicirali standarde. Masne spektre smo posneli v negativni ESI, pri določenih standardih pa še v pozitivni ESI, da smo dobili za standard njegove značilne fragmente. Podatki o standardih so zbrani v preglednici VIII. V vseh primerih, razen pri standardu (-)-epigalokatehingalat, se je pokazalo, da je bazni vrh hkrati tudi molekularni vrh. Standardi so tekom shranjevanja že najbrž razpadli ali pa so prisotni še stranski produkti reakcij pri pridobivanju standarda, saj smo tudi tukaj na kromatogramu posameznega standarda zasledili več vrhov.

Preglednica VIII: Retencijski časi (t_R), molske mase in m/z vrednosti posameznih standardov.

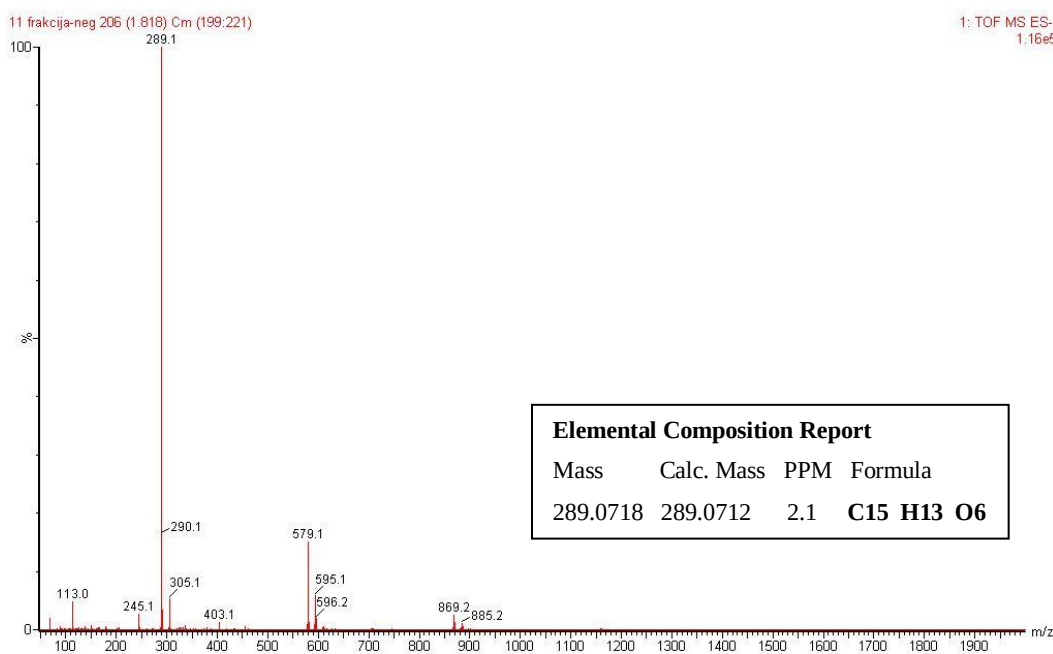
Spojina	t_R (min)	M (g/mol)	m/z vrednost ESI-	m/z vrednost ESI+
katehin	1,8	290.27	289.1 (100 %), 579.2, 869.2, 1159.3	123.0, 139.0, 165.1, 273.1, 291.1 (100 %), 581.2
epikatehin	2,3	290.27	289.1 (100 %), 579.1, 869.2, 1159.3	123.0, 139.0, 165.1, 169.1, 273.1, 291.1 (100 %), 581.2, 871.2
(-)-epigalokatehingalat	2,4	458.37	169.0, 289.1, 457.1 (90.3 %), 547.1, 747.7, 915.2 (100 %), 1373.2	/
kvercetin dihidrat	5,8	338.27	301.0 (100 %), 369.0, 446.0, 603.1	/
ferulna kislina	3,2	194.18	134.0, 178.0, 193.0 (100 %), 341.1, 387.1, 409.1, 581.2, 828.1	/
galna kislina	0,7	170.12	125.0, 169.0 (100 %), 259.0, 291.0, 339.0, 353.0, 479.0, 509.1	/
<i>p</i> -hidroksibenzojska kislina	1,7	138.12	93.0, 137.0 (100 %), 153.0, 275.1, 413.1, 604.0	/
elagna kislina	8,3	302.20	106.0, 301.0 (100 %), 317.0, 400.9, 603.0, 625.0	/

Prisotnost katehina v ekstraktu smo potrdili tudi z LC/MS. Retencijski čas standarda katehina pri analizi z UHPLC je bil 1,8 min. Pri tem času se je iz večih frakcij eluirala spojina, kar pomeni, da je bila presežena kapaciteta kolone in/ali da so bile frakcije kontaminirane še z drugimi (predhodnimi) frakcijami. Z analizo masnega spektra smo potrdili, da gre za katehin. Tako lahko potrdimo našo domnevo o preseženi kapaciteti kolone in o kontaminaciji frakcij tekom njihovega zbiranja na preparativni koloni. Pri HPLC analizi na monolitni koloni je retencijski čas standarda katehina sovpadal s frakcijo 11, zato lahko sklepamo, da je katehin najverjetneje prisoten v frakciji 11. Tudi relativna intenziteta vrha pri $t_R = 1,8$ je najvišja v frakciji 11. Masni spekter frakcije 11 smo posneli tako v negativnem kot tudi v pozitivnem načinu ionizacije. V negativni ESI je lepo videti molekulski vrh, v pozitivnem načinu pa še posamezne fragmente katehina, ki so identični fragmentom standarda katehina. Pri cepitvi molekule poteče retro Diels-Alderjeva reakcija (m/z 139.0), tvorba benzofurana po cepitvi (m/z 123.0, 169.1), cepitev heterocikličnega obroča (m/z 165.1) in odcep molekule vode (m/z 273.1). Fragment m/z 291.1 je molekulski vrh, 581.2 pa $[2M+H]^+$ ion. V negativni metodi so zraven molekulskega vrha pri m/z 289.1 vidni še $[2M-H]^-$ ion pri m/z 579.1 in $[3M-H]^-$ ion pri m/z 869.2. Ker ESI ne more ločiti med izomernimi spojinami sta spektra katehina in njegovega diastereoizomera epikatehin enaka. Prisotnost slednjega smo izključili na podlagi retencijskega časa

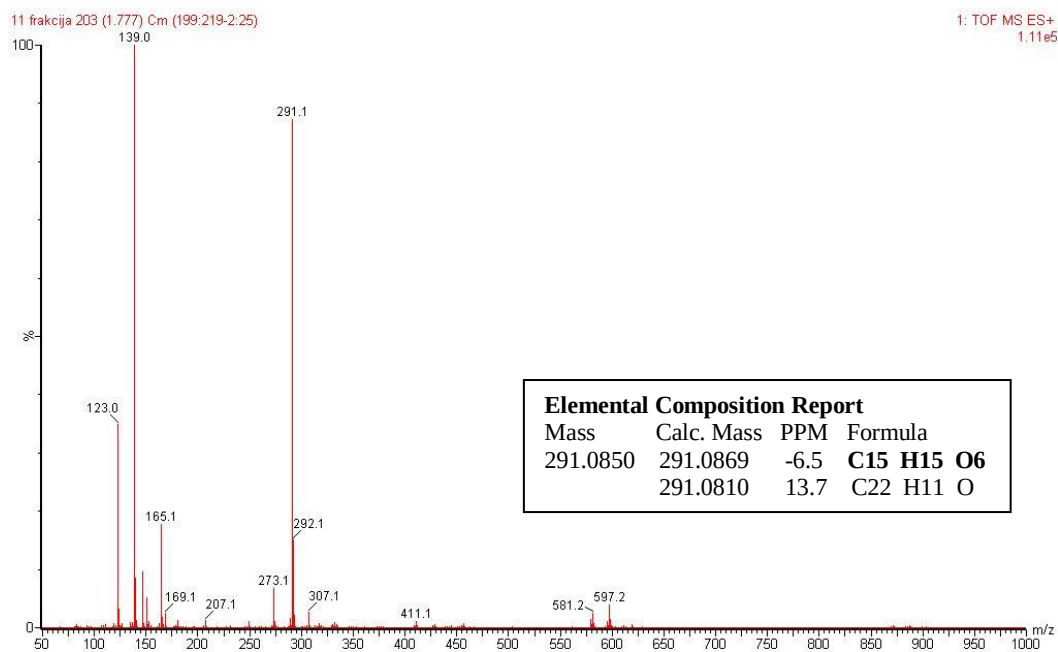
standarda epikatehina ($t_R = 2,3$ min). Kljub temu, da smo kot standard uporabili (+)-katehin in da je ta v naravi bolj pogost kot njegova enantiomera pa ne moremo z gotovostjo trditi, da ekstrakt vsebuje (+)-katehin. Tudi na reverzno fazni stacionarni fazi se enantiomera (+)-katehin in (-)-katehin ne bi ločila. Tako je možno, da imamo v ekstraktu namesto (+)-katehina prisoten enantiomer (-)-katehin. Na sliki 33 je prikazan LC/MS kromatogram frakcije 11, na slikah 34 in 35 masni spekter katehina v negativni in pozitivni ESI in na sliki 36 še način fragmentacije katehina in epikatehina.



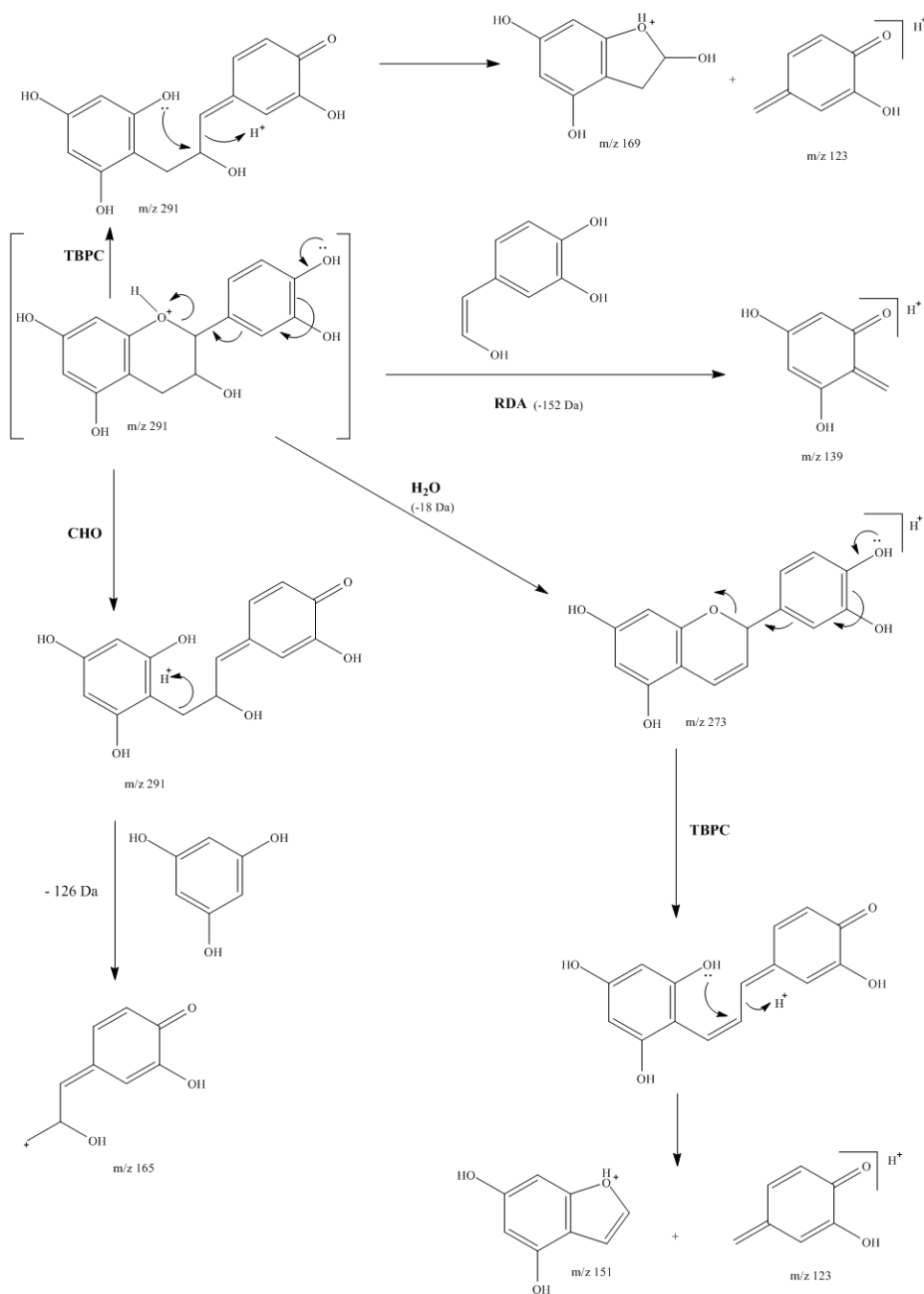
Slika 33: LC/MS kromatogram frakcije 11.



Slika 34: Masni spekter katehina, posnet v negativni ESI.



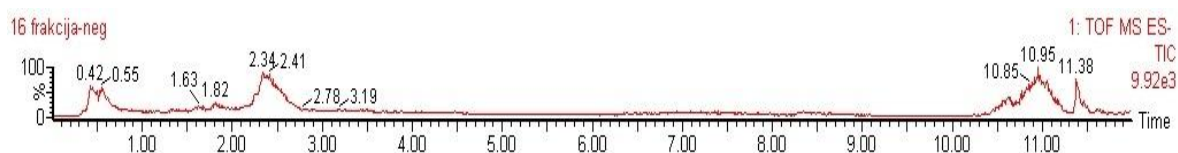
Slika 35: Masni spekter katehina, posnet v pozitivni ESI.



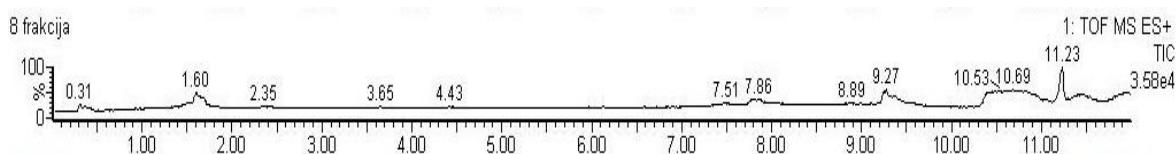
Slika 36: Način fragmentacije katehina in epikatehina v pozitivni ESI (CHO = cepitev heterocikličnega obroča, RDA = retro Diels-Alderjeva reakcija, TBPC = tvorba benzofurana po cepitvi) (48).

Z LC/MS smo potrdili tudi prisotnost epikatehina v ekstraktu. Retencijski čas standarda epikatehina pri analizi z UHPLC je bil 2,3 min. Pri tem času se je iz večih frakcij eluirala spojina. Z analizo masnega spektra smo potrdili, da gre za epikatehin. Pri HPLC analizi na monolitni koloni je retencijski čas standarda epikatehina sovpadal s frakcijo 16, zato lahko

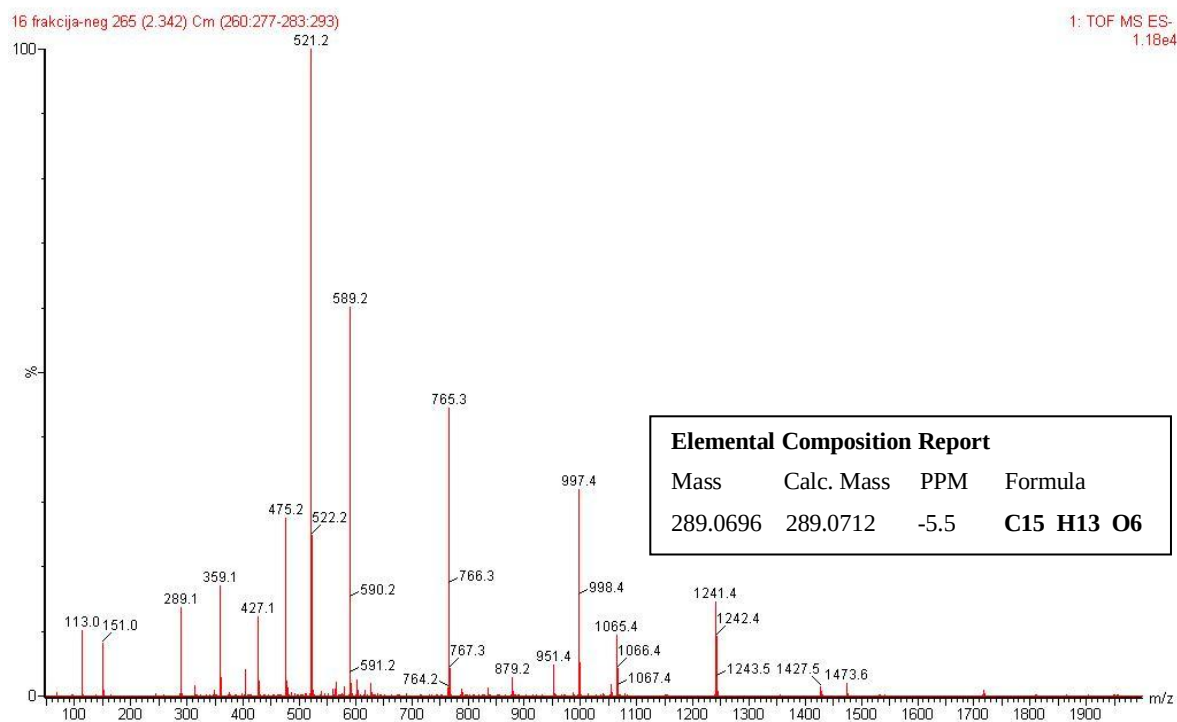
sklepamo, da je epikatehin najverjetneje prisoten v frakciji 16. Tudi relativna intenziteta vrha pri $t_R = 2,3$ je najvišja v frakciji 16. Sicer smo zasledili vrh z visoko intenziteto tudi v frakciji 17, ampak to bi lahko pripisali kontaminaciji frakcij tekom zbiranja na preparativni koloni. Spekter frakcije 16 smo posneli tako v negativnem (slika 39) kot tudi v pozitivnem (slika 40) načinu. Oba spektra sta bila kompleksna. V frakciji 16 je zraven epikatehina prisotna še ena ali morda več spojin, ki se niti s HPLC na monolitni koloni niti z UHPLC niso ločile. Kljub temu je pri spektru, posnetemu v negativni metodi, viden vrh epikatehina pri m/z 289.1 in pri spektru v pozitivni metodi prav tako njegov vrh in še nekatere njegove fragmente (m/z 291.1, 123.0, 139.0). Spektri drugih frakcij, v katerih je bil prisoten epikatehin so bili enostavnejši. Primer takega spektra frakcije 8 je prikazan na sliki 41. Pri cepitvi molekule poteče retro Diels-Alderjeve reakcija (m/z 139.0), tvorba benzofurana po cepitvi (m/z 123.0, 169.1), cepitev heterocikličnega obroča (m/z 165.1) in odcep molekule vode (m/z 273.1). Fragment m/z 291.1 je molekulski vrh. Vsi naštet fragmenti so identični fragmentom standarda epikatehina. Kot pri katehinu tudi pri epikatehinu ne moremo zaključiti, da ekstrakt kljub uporabljenemu standardu (-)-epikatehin vsebuje prav ta enantiomer. Ne smemo izključiti možnosti prisotnosti (+)-epikatehina. LC/MS kromatograma frakcij 16 in 8 sta prikazana na slikah 37 in 38.



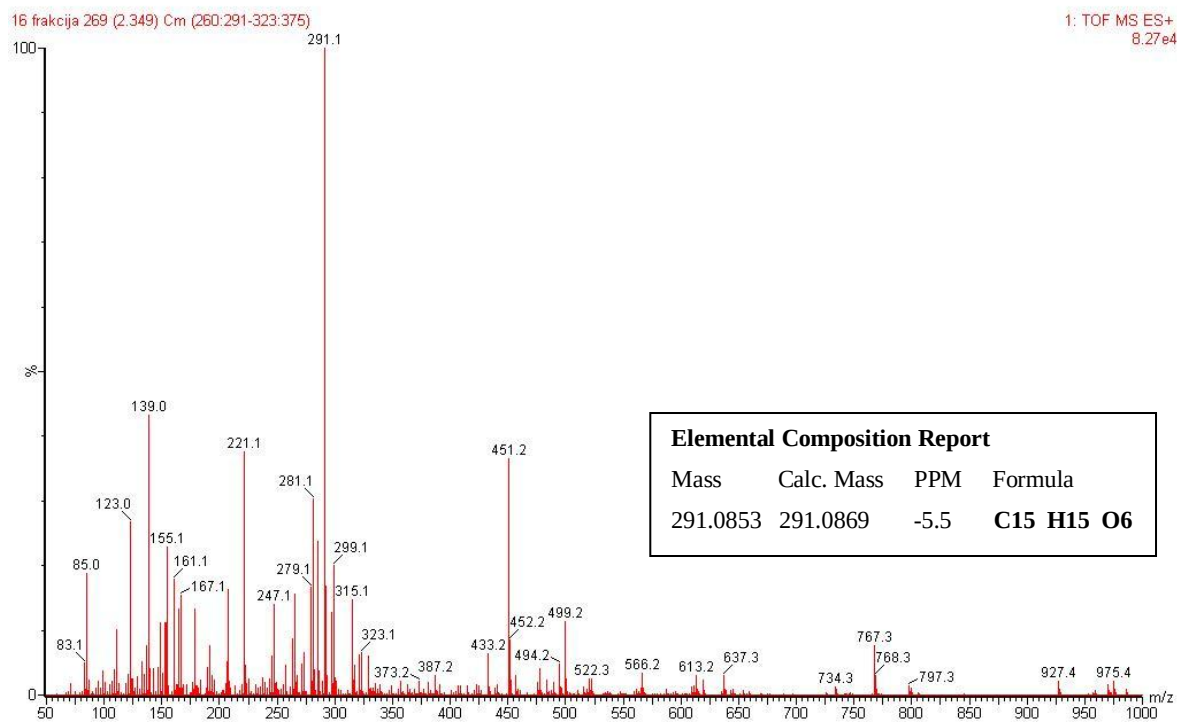
Slika 37: LC/MS kromatogram frakcije 16.



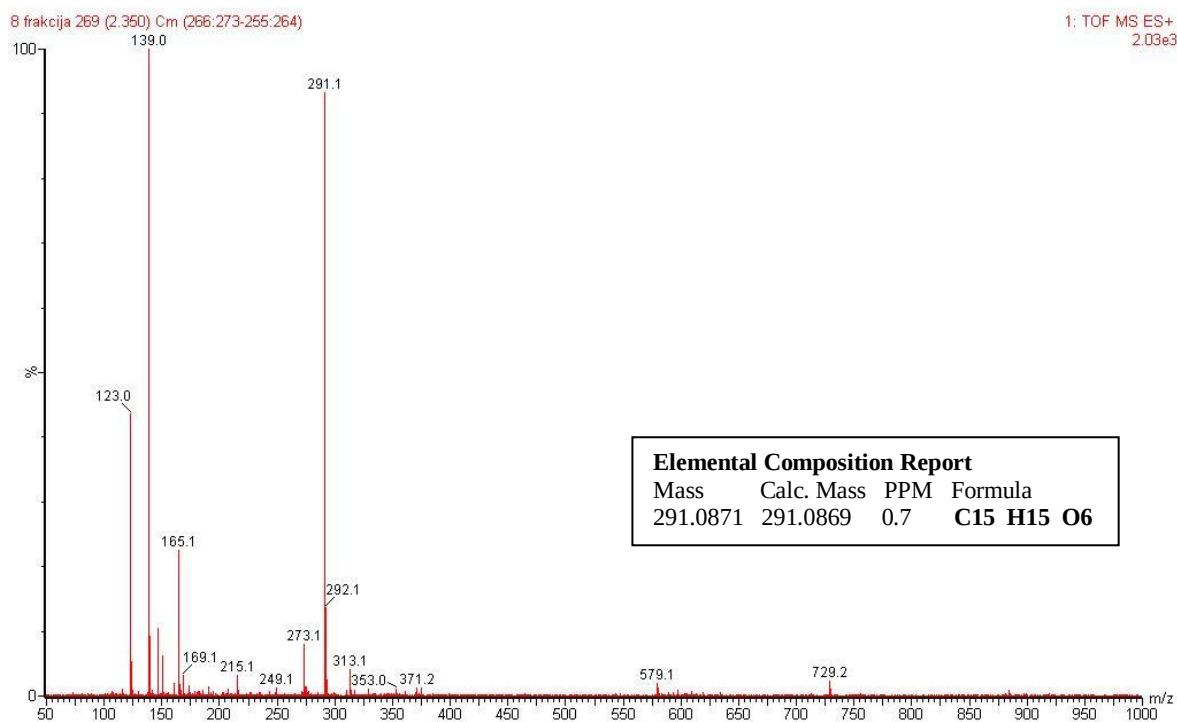
Slika 38: LC/MS kromatogram frakcije 8.



Slika 39: Masni spekter epikatehina, posnet v negativni ESI.

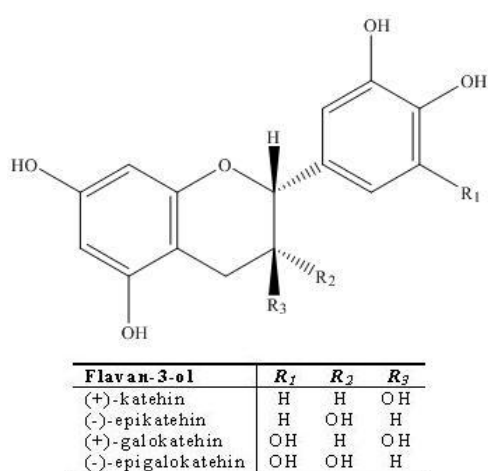


Slika 40: Masni spekter epikatehina, posnet v pozitivni ESI.



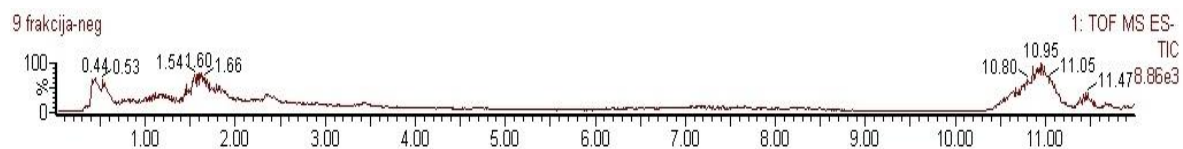
Slika 41: Masni spekter epikatehina v frakciji 8 kot posledica presežene kapacitete kolone, posnet v pozitivni ESI.

V ekstraktu smo identificirali galokatehin oz. epigalokatehin. Ta spojina se je eluirala pri retencijskem času 1,6 min in podobno kot katehin in epikatehin iz večih frakcijah. Ker nismo imeli standarda, nismo mogli potrditi ali gre za galokatehin ali za epigalokatehin. Vrh pri 1,6 min je najbolj intenziven v frakciji 9 (slika 43), iz česa bi lahko sklepali, da je spojina po vsej verjetnosti prisotna v tej frakciji. Pri spektru, posnetemu z negativno metodo (slika 44), je lep razviden molekulski vrh pri m/z 305.1. Pri m/z 611.1 zasledimo

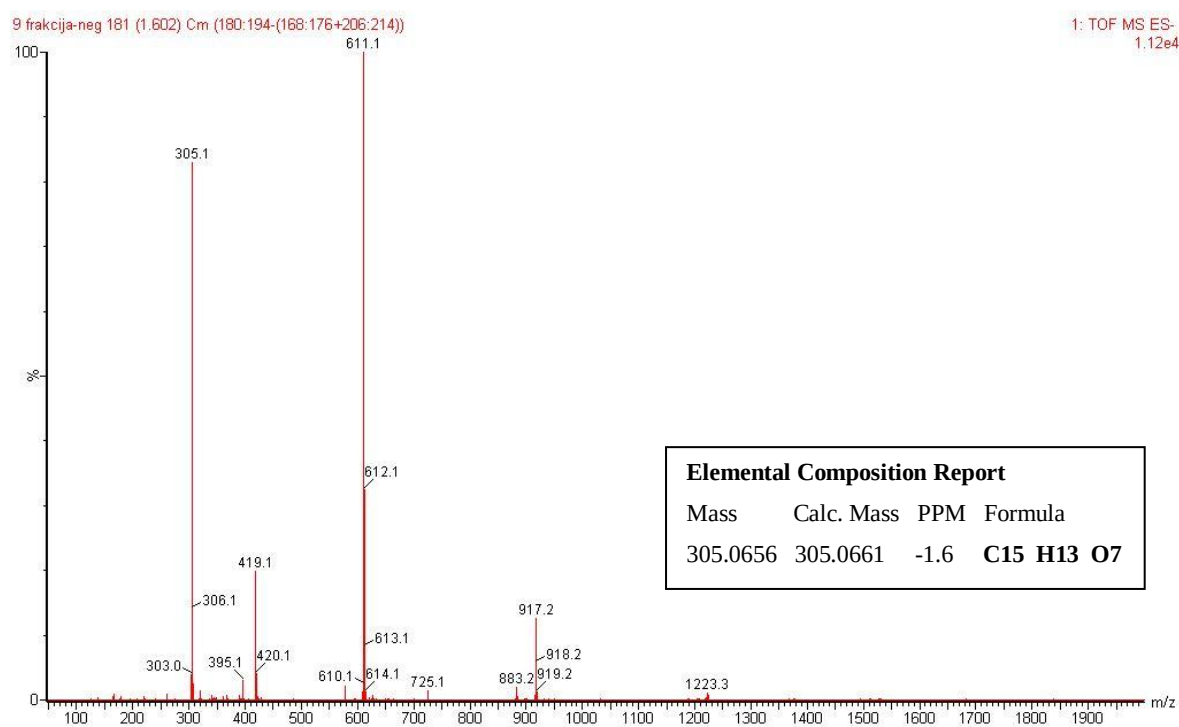


Slika 42: Predvidene spojine v Abigenolu®.

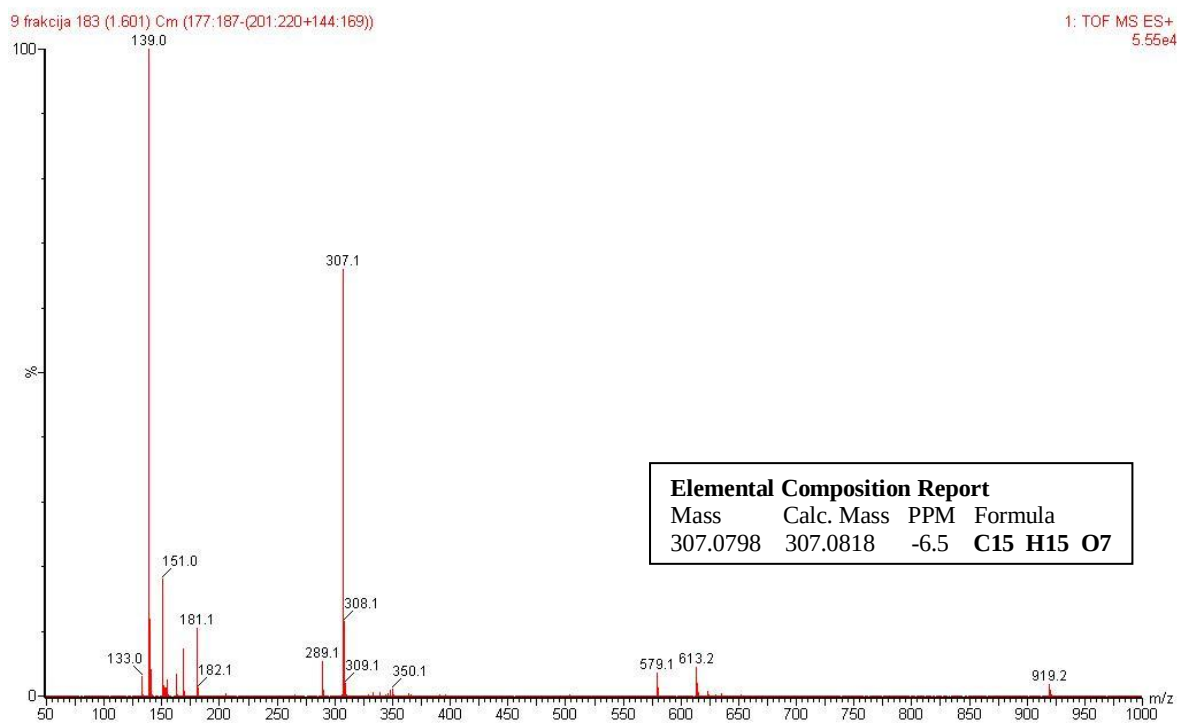
[2M-H]⁻ ion, pri 917.2 [3M-H]⁻ ion in pri 1223.3 še [4M-H]⁻ ion. V pozitivni metodi (slika 45) je molekulski vrh pri m/z 307.1. Produkt retro Diels-Alderjeve reakcije je viden pri m/z 139.0, produkt tvorbe benzofurana po cepitvi pri m/z 139.0 in 151.0, produkt cepitve heterocikličnega obroča pri 181.1 in produkt odcepa molekule vode pri m/z 289.1. Fragment m/z 613.2 je [2M+H]⁺ ion, fragment 919.2 pa [3M+H]⁺ ion. Način fragmentacije (epi)galokatehina prikazuje slika 46.



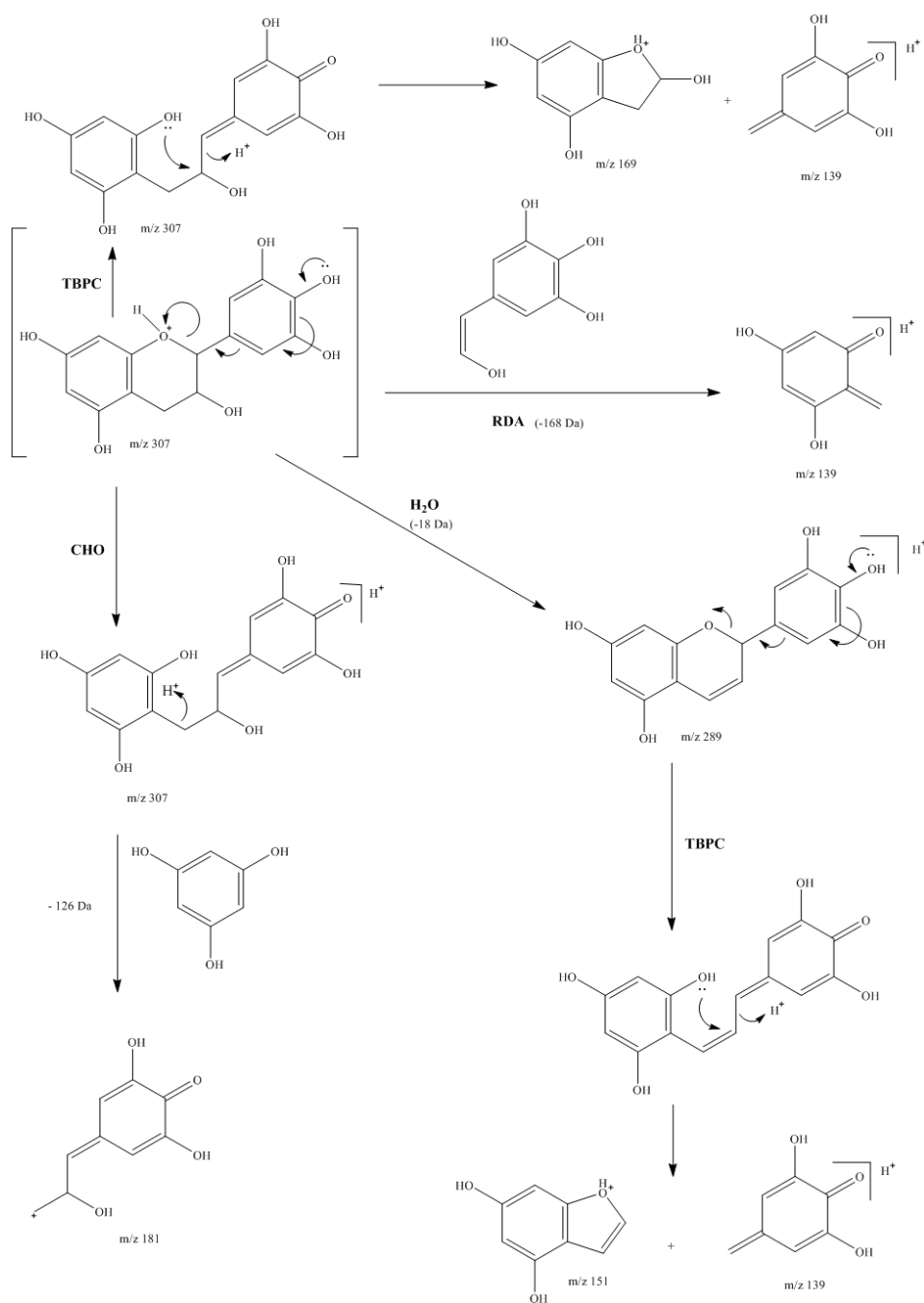
Slika 43: LC/MS kromatogram frakcije 9.



Slika 44: Masni spekter (epi)galokatehina, posnet v negativni ESI.



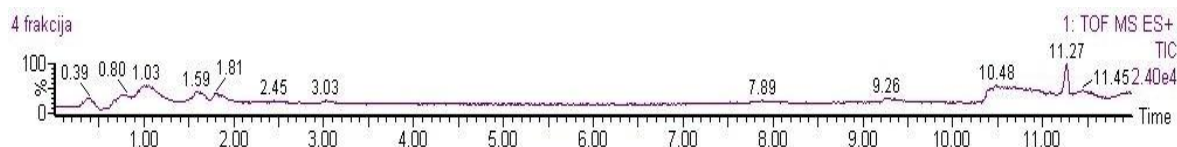
Slika 45: Masni spekter (epi)galokatehina, posnet v pozitivni ESI.



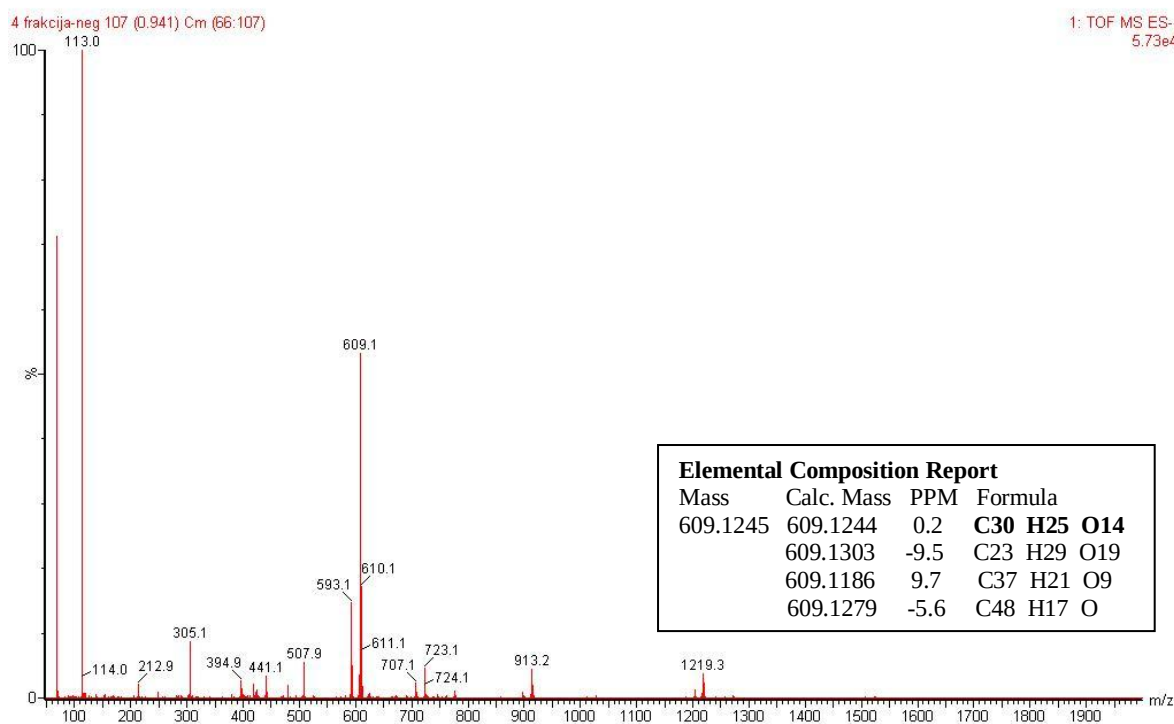
Slika 46: Način fragmentacije (epi)galokatehina v pozitivni ESI (CHO = cepitev heterocikličnega obroča, RDA = retro Diels-Alderjeva reakcija, TBPC = tvorba benzofurana po cepitvi).

V večih frakcijah smo pri retencijskem času okoli 1 min opazili prisotnost dimera (epi)galokatehin-(epi)galokatehin. Ker nismo imeli standarda, nismo mogli ugotoviti ali sta med seboj povezana dva epigalokatehina ali dva galokatehina ali pa morda eden epigalokatehin in eden galokatehin. Molekulski vrh je v negativni metodi viden pri m/z 609.1 (slika 48). Fragment 113 je TFA, 305.1 (epi)galokatehin, 441.1 produkt retro Diels-

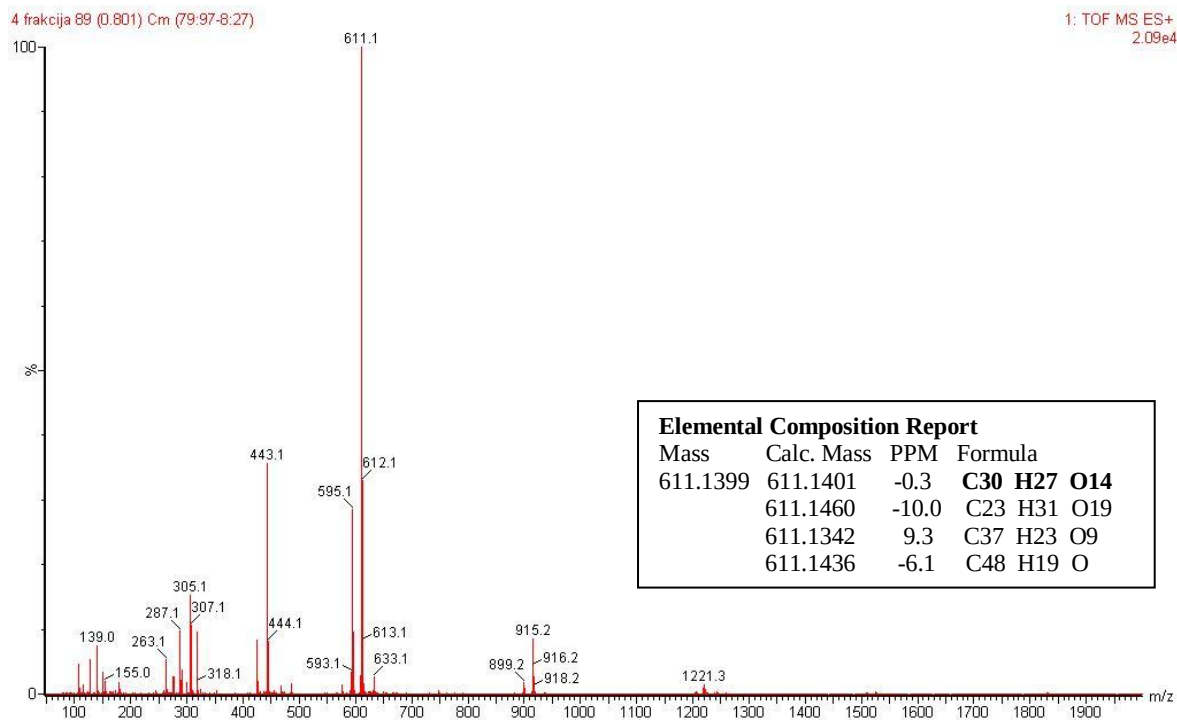
Alderjeve reakcije in $1219.3 [2M-H]^-$ ion. Pri pozitivni metodi (slika 49) je molekulski vrh pri m/z 611.1, (epi)galokatehin pri m/z 307.1, produkt retro Diels-Alderjeve reakcije pri m/z 443.1 in ion $[2M+H]^+$ pri m/z 1221.3. Najverjetneje je dimer prisoten v frakciji 4. Slika 47 prikazuje LC/MS kromatogram frakcije 4, slika 50 pa hipotezni dimer in produkt retro Diels-Alderjeve reakcije.



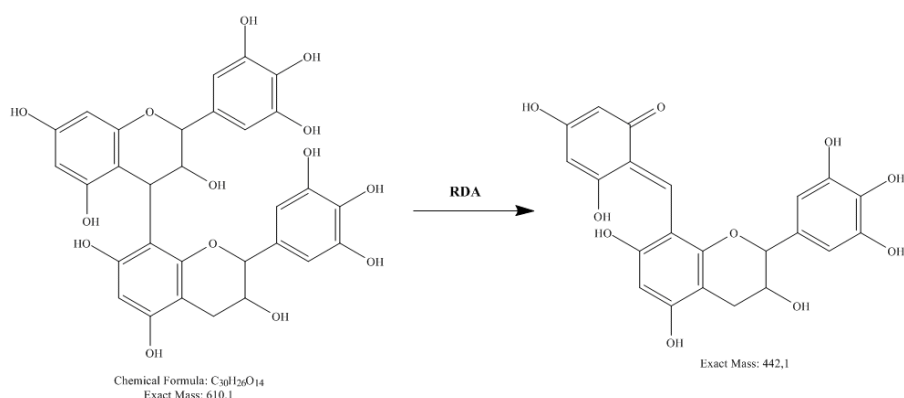
Slika 47: LC/MS kromatogram frakcije 4.



Slika 48: Masni spekter dimera (epi)galokatehin-(epi)galokatehin, posnet v negativni ESI.



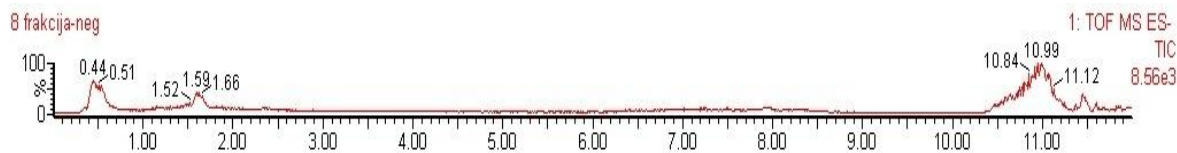
Slika 49: Masni spekter dimera (epi)galokatehin-(epi)galokatehin, posnet v pozitivni ESI.



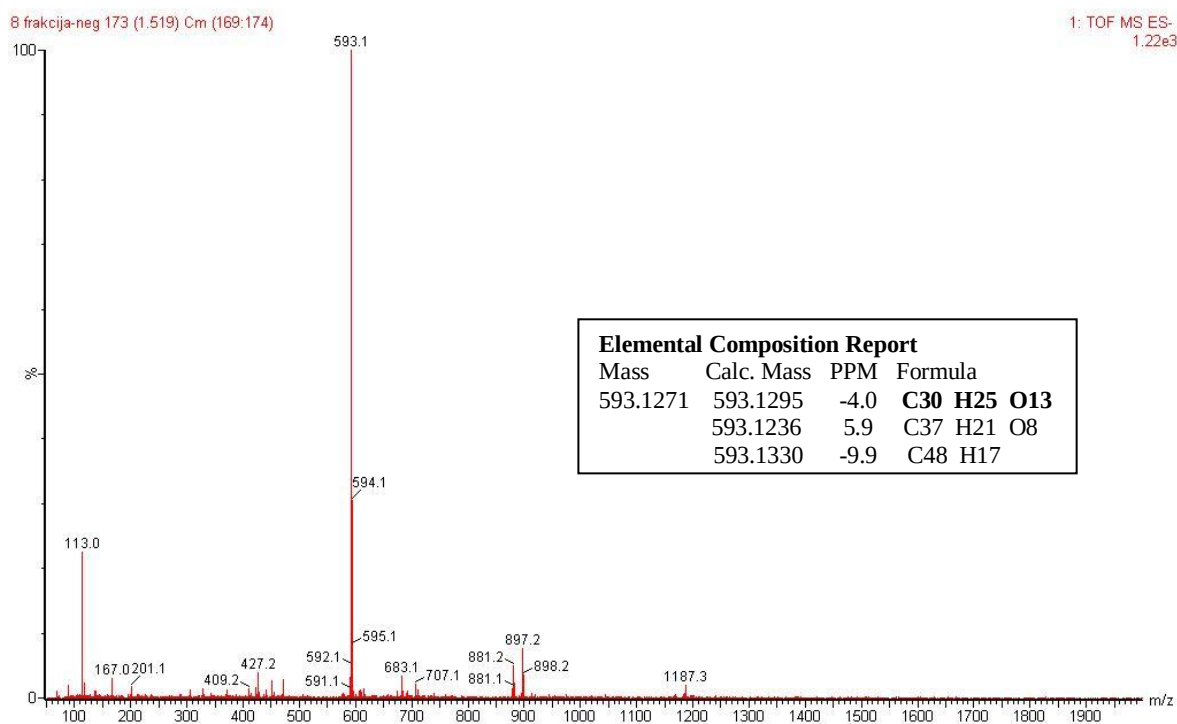
Slika 50: Hipotezni dimer (epi)galokatehin-(epi)galokatehin in produkt RDA reakcije.

V ekstraktu smo pri retencijskem času 1,5 min identificirali tudi dimer (epi)galokatehin-(epi)katehin ali (epi)katehin-(epi)galokatehin. Natančne strukture zaradi pomanjkanja standarda nismo mogli določiti. V negativni metodi (slika 52) je lepo viden molekulski vrh pri m/z 593.1. Pri m/z 113.0 je fragment TFA, pri m/z 1187.3 pa $[2M-H]^-$ ion. V pozitivni ESI (slika 53) je videti molekulski vrh pri 595.1 in pri m/z 427.1 produkt retro Diels-Alderjeve reakcije. Najverjetneje je dimer prisoten v frakciji 8. Na sliki 51 je prikazan

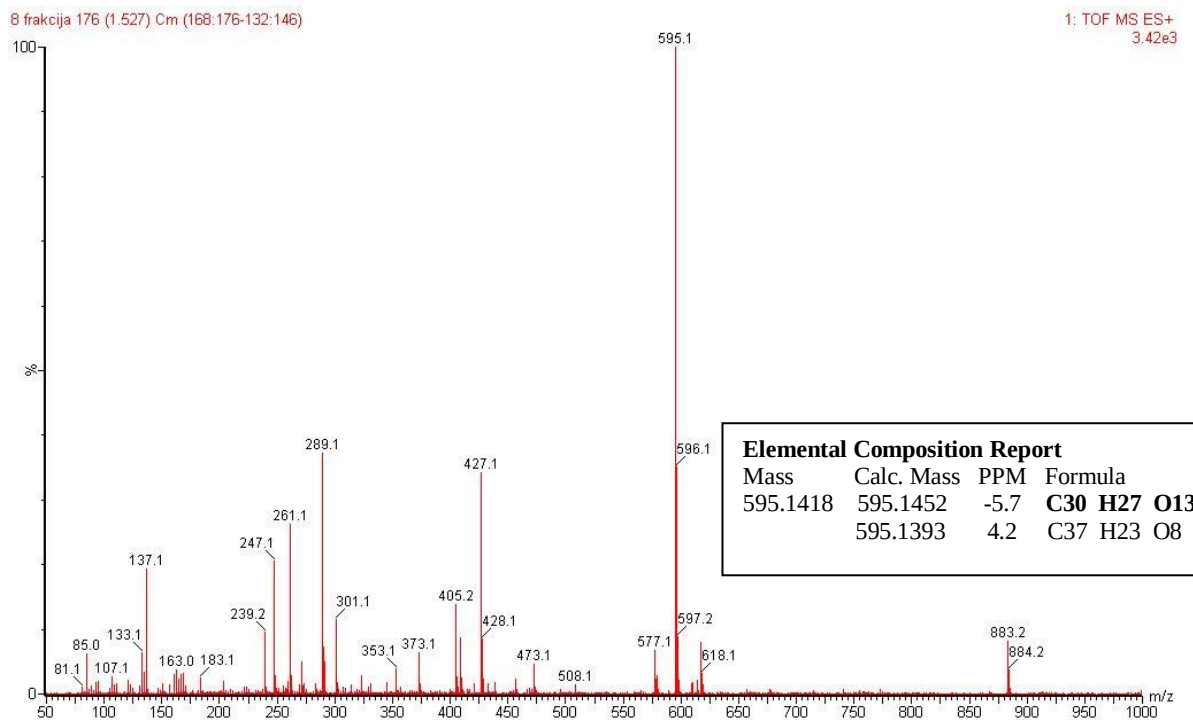
LC/MS kromatogram frakcije 8, na sliki 54 pa hipotezni dimer in produkt retro Diels-Alderjeve reakcije.



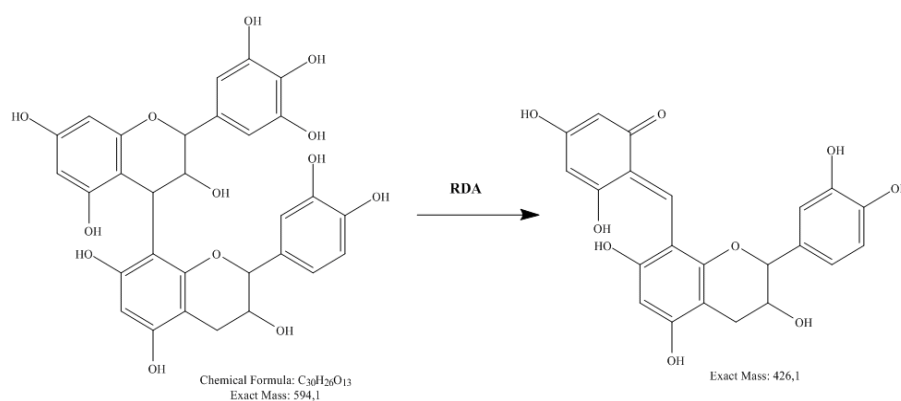
Slika 51: LC/MS kromatogram frakcije 8.



Slika 52: Masni spekter dimera (epi)galokatehin-(epi)katehin, posnet v negativni ESI.



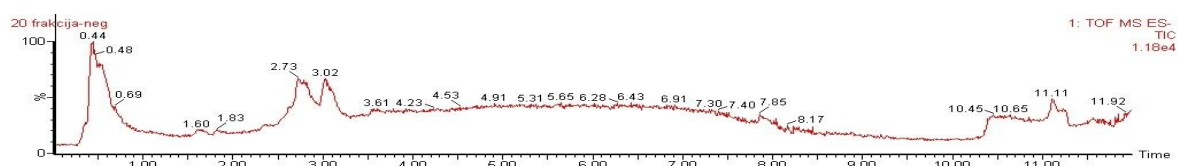
Slika 53: Masni spekter dimera (epi)galokatehin-(epi)katehin, posnet v pozitivni ESI.



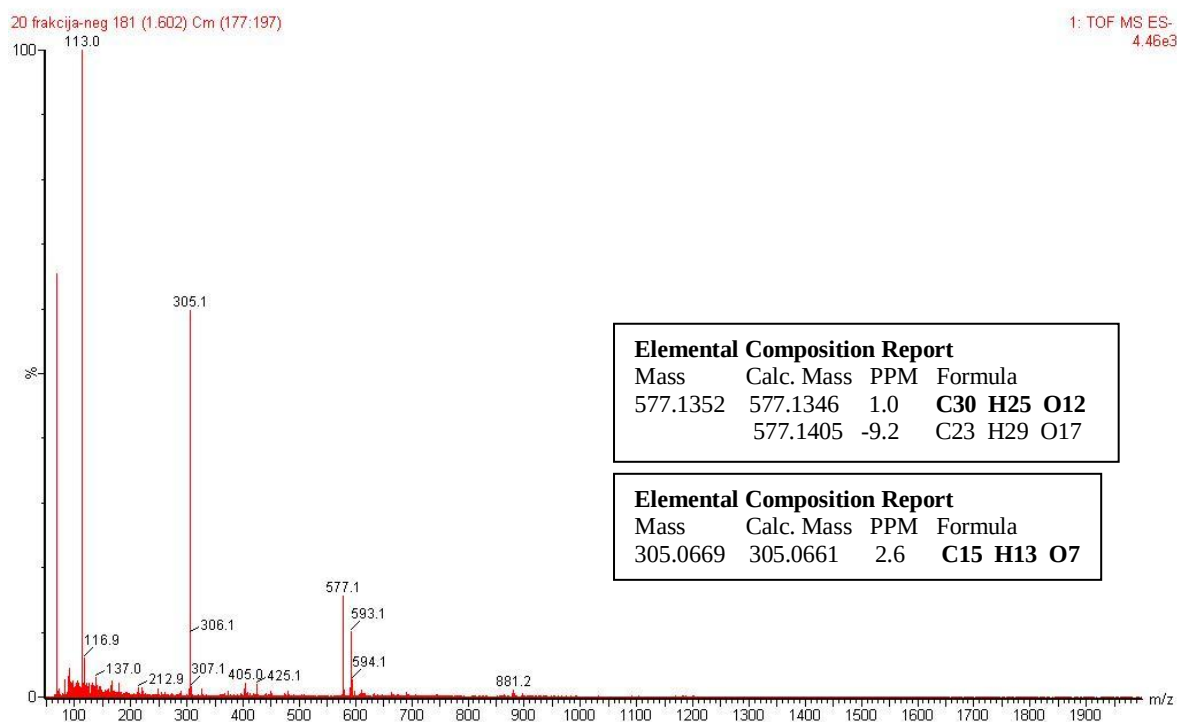
Slika 54: Hipotezni dimer (epi)galokatehin-(epi)katehin in produkt RDA reakcije.

Pri retencijskem času 1,6 min smo v nekaterih frakcijah opazili tudi dimer (epi)katehin-(epi)katehin. Prvič smo opazili največjo relativno intenziteto vrha tega dimera v frakciji 12, še bolj značilen spekter pa v frakciji 20. Ker nismo imeli standarda, nismo mogli ugotoviti ali sta med seboj povezana dva epikatehina, dva katehina ali pa morda eden epikatehin in eden katehin. Pri tem retencijskem času se je koeluiral (epi)galokatehin, katerega vrh lahko opazimo v masnem spektru. V negativni ESI (slika 56) je pri m/z 113.0 TFA, 305.1 (epi)galokatehin, 425.1 produkt retro Diels-Alderjeve reakcije dimera in pri 577.1 dimer

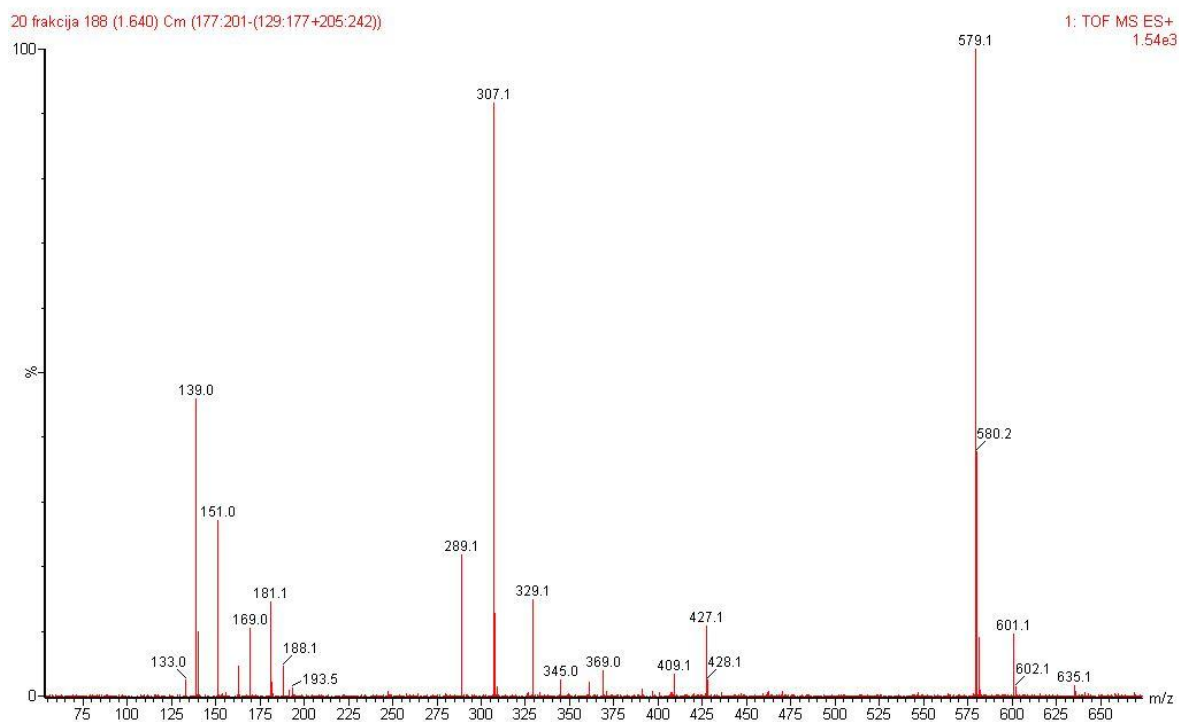
(epi)katehin-(epi)katehin. V pozitivni ESI (slika 57) je vidnih več fragmentov (epi)galokatehina, in sicer: produkt retro Diels-Alderjeve reakcije pri m/z 139.0, produkt tvorbe benzofurana po cepitvi pri m/z 139.0, 151.0 in 169.0, produkt cepitve hetrocikličnega obroča pri m/z 181.1, produkt odcepa molekule vode pri m/z 289.1 in vrh (epi)galokatehina pri m/z 307.1. Fragment dimera je viden pri m/z 579.1, pri 427.1 njegov produkt retro Diels-Alderjeve reakcije in nato še pri 409.1 produkt odcepa molekule vode. Fragment pri m/z 289.1 je prav tako lahko produkt dimera, kjer poteče cepitev kinon-metid. Slika 55 prikazuje LC/MS kromatogram frakcije 20, slika 58 pa hipotezni dimer in njegov način fragmentacije.



Slika 55: LC/MS kromatogram frakcije 20.



Slika 56: Masni spekter dimera (epi)katehin-(epi)katehin, posnet v negativni ESI.



Slika 57: Masni spekter dimera (epi)katehin-(epi)katehin, posnet v pozitivni ESI.

Slika 57:

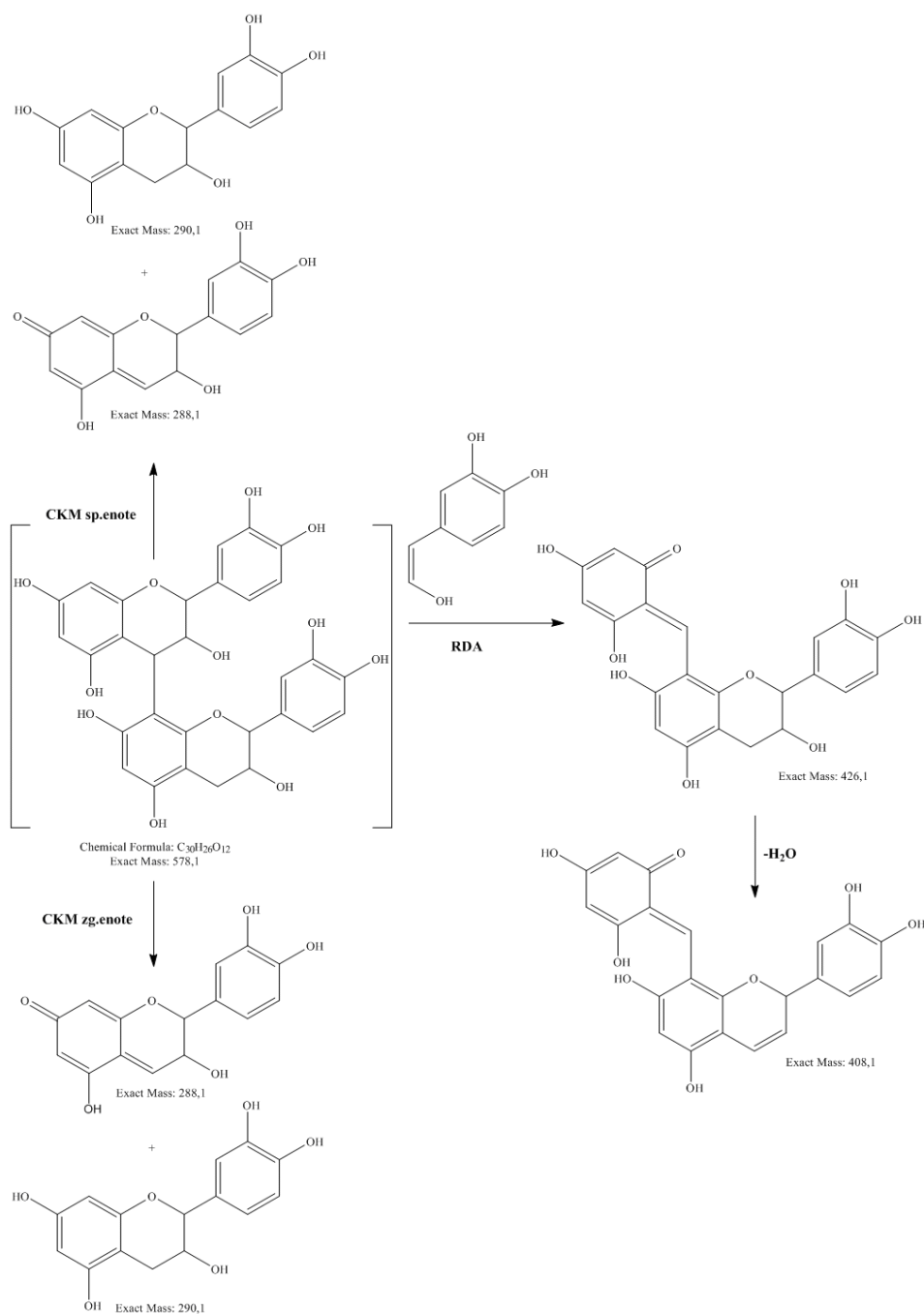
Elemental Composition Report

Mass	Calc. Mass	PPM	Formula
307.0799	307.0818	-6.2	C15 H15 O7

Slika 57:

Elemental Composition Report

Mass	Calc. Mass	PPM	Formula
579.1479	579.1503	-4.1	C30 H27 O12
579.1444		6.0	C37 H23 O7



Slika 58: Hipotezni dimer (epi)katehin-(epi)katehin in njegov način fragmentacije (RDA = retro Diels-Alderjeva reakcija, CKM = cepitev kinon-metid).

Po literaturnih podatkih (39), se trihidroksilirani flavanoli (galokatehini in prodelfinidini) na reverzno fazni koloni eluirajo pred dihidroksiliranimi (katehini, procianidini) flavanoli, ker so od njih bolj polarni. 2*R*,3*S* - flavanoli ((galo)katehini) se eluirajo prej kot 2*R*,3*R* - flavanoli (epi(galo)katehini). Vrstni red elucije pri nas je bil: (epi)galokatehin < katehin < epikatehin, kar je v skladu z literaturnimi podatki. Po teoriji se v primeru oligomerov

eluirajo oligomeri, ki imajo končno enoto (galo)katehin, pred tistimi s končno enoto epi(galo)katehin. Prav tako se spojine z C-4-C-6 ali A tipom interflavanske povezave eluirajo kasneje kot njihovi C-4-C-8 izomeri. Pričakovan vrstni red elucije je tako: *galokatehin-galokatehin* < *galokatehin* < *galokatehin-katehin* < *galokatehin-(4,6)-katehin* < *katehin-katehin* (B3) < *epikatehin-katehin* (B1) < *katehin* < *epigalokatehin* < *katehin-(4,6)-katehin* (B6) < *katehin-epikatehin* (B4) < *epikatehin-epikatehin* (B2) < *epikatehin*, pri čemer ima epikatehin najdaljši retencijski čas, interflavanske povezave pa so C-4-C-8, razen če ni posebej omenjeno. Vrstni red elucije teh spojin se lahko včasih tudi spremeni - odvisno od uporabljene metode. Omenjeno je še tipično prekrivanje vrhov med galokatehinom in oligomeri prodelfinidinov. V našem primeru pa je vrstni red elucije naslednji: *(epi)galokatehin-(epi)galokatehin* < *(epi)galokatehin-(epi)katehin* < *(epi)galokatehin* = *(epi)katehin-(epi)katehin* < *katehin* < *epikatehin*. Ta dejstva nam dajo še dodatno potrditev, da ekstrakt lubja navadne jelke vsebuje omenjene spojine. Vse identificirane strukture dimerov so med seboj povezane z C-C vezjo; gre za B tip proantocianidinov.

Pregledali smo še druge masne spektre, vendar so bili nekateri od njih še vedno prekompleksni za interpretacijo. Tudi spojin iz frakcije 23, ki da na HPLC kromatogramu najvišji vrh, nismo uspeli identificirati. Višjih oligomerov od dimerov v ekstraktu nismo zasledili, prav tako nismo zasledili prisotnosti desmetilabietospirana ali abietospirana. Pokazalo se je, da ekstrakt ne vsebuje nobenih kislin, kvercetin dihidrata ali (-)-epigalokatehingalata, ki smo jih injicirali kot standarde.

6 SKLEPI

1. Ekstrakcijo iz lubja navadne jelke smo izvedli po patentnem postopku. Ugotovili smo, da je ekstrakcijo bolje izvajati iz sveže posušenega spomladanskega kot pa starega spomladanskega ali jesenskega lubja. Sveže spomladansko lubje se je izkazalo za najbolj primeren vir, saj je bil izkoristek izolacije največji, prav tako antioksidativna aktivnost, določena z DPPH metodo.

2. S TLC analizo smo po orositvi z reagentoma vanilin/HCl in NST/PEG želeli pridobiti predhodne informacije o prisotnosti proantocianidinov in flavonov oz. flavonolov v posameznih frakcijah. Pri ploščah, orošenih z vanilinom, se je pojavila oranžna do rdeča lisa skoraj v vseh frakcijah, ponekod se je obarvalo tudi več lis. Slednje bi lahko pripisali neuspešni ločitvi spojin s HPLC metodo ali preseženi kapaciteti kolone ali pa kontaminaciji frakcij tekom njihovega zbiranja na preparativni koloni. Kjer se v frakciji ni obarvala nobena lisa, tam ni proantocianidinov ali jih ni v večjih količinah. Ker nobena od lis Abigenola[®] ali frakcij ni ostala na startu, smo sklepali, da Abigenol[®] ne vsebuje oligomernih proantocianidinov, višjih od heptamerov. V nekaterih frakcijah so se pojavile modre in vijoličaste lise, kar pomeni, da so v ekstraktu prisotni tudi saponini. Po orositvi z NST/PEG nobena lisa ni fluorescirala rumeno, tako da v frakcijah ni flavonov in flavonolov ali jih ni v večjih količinah. Nekatere frakcije so fluorescirale modro, kar nakazuje na prisotnost organskih kislin ali ogljikohidratov.

3. Z DPPH, vanilin/HCl in s Folin-Ciocalteau-jevo metodo smo spektrometrijsko določili antioksidativno aktivnost polifenolnih spojin, vsebnost proantocianidinov in polifenolov v posameznih frakcijah. Koncentracije polifenolov v posameznih frakcijah so večinoma nižje od koncentracij proantocianidinov. To bi lahko obrazložili z boljšo občutljivostjo vanilin/HCl metode. Vse frakcije, razen frakcije 7, izkazujejo antioksidativno aktivnost. Frakcija 7 kaže prooksidativno aktivnost.

4. Ugotavljali smo korelacijo med vsebnostjo polifenolnih spojin oz. proantocianidinov v ekstraktu in njegovo antioksidativno aktivnostjo. Visok korelacijski koeficient ($R^2 = 0,8303$) pri polifenolih nakazuje, da so za antioksidativno aktivnost ekstrakta odgovorne polifenolne spojine. Pri proantocianidinih smo dobili nižji koeficient korelacije ($R^2 =$

0,7255), kar pomeni, da antioksidativna aktivnost ekstrakta ni odvisna le od vsebnosti proantocianidinov, ampak tudi še od nekaterih drugih polifenolov.

5. Z UHPLC smo dosegli boljšo ločitev med spojinami kot pri HPLC z monolitno kolono. Z masno spektrometrijo smo v Abigenolu[®] identificirali šest spojin, in sicer:

- monomer katehin
- monomer epikatehin
- monomer (epi)galokatehin
- dimer (epi)galokatehin-(epi)galokatehin
- dimer (epi)galokatehin-(epi)katehin oz. (epi)katehin-(epi)galokatehin
- dimer (epi)katehin-(epi)katehin

Vsi dimeri so med seboj povezani z C-C vezjo; gre za B tip proantocianidinov. Te spojine so se zaradi presežene kapacitete kolone ali zaradi kontaminacije frakcij tekom njihovega zbiranja na preparativni koloni pojavljale v večjih frakcijah. Prisotnost katehina in epikatehina smo določili tudi s HPLC in TLC analizo (uporaba standardov). Višjih oligomerov od dimerov v frakcijah nismo zasledili, prav tako ne nekaterih spojin, ki smo jih injicirali kot standarde (različne kisline, kvercetin dihidrat, (-)-epigalokatehingalat).

6. V prihodnje bi bilo potrebno doseči boljšo ločitev med komponentami v ekstraktu, npr. s podaljšanjem časa HPLC metode na več kot na eno uro, dobiti dovolj koncentrirane in čiste (s tem, da ne bi presegli kapacitete kolone in da bi preprečili kontaminacijo frakcij tekom njihovega zbiranja na preparativni koloni) vzorce in nato še podrobneje določiti strukturo že identificiranih spojin. Z jedrsko magnetno resonanco (NMR) ali s standardnimi spojinami bi lahko ugotovili, ali so enote v dimerih med seboj povezane s C-4-C-8 ali s C-4-C-6 vezjo, v primeru (epi)galokatehina in posameznih enot dimerov še diastereoizomero ter zaporedje enot v primeru dimera (epi)galokatehin-(epi)katehin.

7 LITERATURA

1. Gornik Bučar D: Izkoriščanje žagarskih dodatkov. Zbornik gozdarstva in lesarstva 1997; 53: 127-137.
2. Tišler V: Kemija in uporaba drevesnih skorij: letno poročilo za leto 1987, VDO Biotehniška fakulteta, VTOZD za lesarstvo, Ljubljana, 1987.
3. Tišler V: Kemija lesa: nerecenzirano študijsko gradivo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Ljubljana, 1986.
4. Kreft S, Pečar S: Vloga radikalov pri obolenjih. Farm vestn 1998; 49: 469-481.
5. Pečar S: Antioksidanti, Prehranska dopolnila-zdravila ali hrana, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2001/2002: 97-104.
6. Bresjanac M, Bunc M, Črne-Finderle N, Grubič Z, Kamarič L, Kordaš M, Pavlin R, Ribarič S, Sket D, Sketelj J, Šuput D, Zorec R, Živin M: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9. izdaja. Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2005: 15-36.
7. Perdih A, Pečar S: Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine. Farm vestn 2006; 57: 24-29.
8. Gašperlin M, Zajc N: Naravne sestavine kozmetičnih izdelkov, Zdravila naravnega izvora in sodobna fitoterapija, Zbornik podiplomskega strokovnega izobraževanja, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2003: 163-165.
9. Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M: Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J. Agric. Food Chem. 1999; 47, 3954-3962.
10. Bruneton J: Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants. 2nd Ed.. Lavoisier, France, 1999: 310-345, 370-403.
11. Abram V: Antioksidativno delovanje flavonoidov, Antioksidanti v živilstvu, 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, 2000: 23-31.
12. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. Journal of Nutritional Biochemistry 2002; 13: 572-584.
13. Pietta PG: Flavonoids as Antioxidants. J. Nat. Prod. 2000; 63: 1035-1042.

14. Arora A, Nair MG, Strasburg GM: Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology & Medicine* 1998; 24: 1355-1363.
15. Mravljak J, Peterlin Mašič L: Resnice in polresnice o antioksidantih, Prehranska dopolnila II, strokovno izobraževanje, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010: 7-31.
16. Cao G, Sofic E, Prior RL: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine* 1997; 22: 749-760.
17. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C: Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine* 2004; 36: 838-849.
18. Leite da Silva Porto PA, Laranjinha JAN, Pereira de Freitas VA: Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66: 947-954.
19. 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.
20. Chida M, Suzuki K, Nakanishi-Udea T, Ueda T, Yasuhara H, Koide R, Armstrong D: In vitro testing of antioxidants and biochemical end-points in bovine retinal tissue. *Opthalmic Res* 1999; 31: 407-415.
21. Jerez M, Tourino S, Sineiro J, Torres JL, Nunez MJ: Procyanidins from pine bark: Relationships between structure, composition and antiradical activity. *Food Chemistry* 2007; 104: 518-527.
22. Ku CS, Jang JP, Mun SP: Exploitation of polyphenol-rich pine barks for potent antioxidant activity. *J Wood Sci* 2007; 53: 524-528.
23. Romani A, Ieri F, Turchetti B, Mulinacci N, Vincieri FF, Buzzini P: Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; 41: 415-420.
24. Yang XW, Li SM, Shen YH, Zhang WD: Phytochemical and biological studies of *Abies* species. *Chemistry & Biodiversity* 2008; 5: 56-81.
25. O'Neill JA, Gallagher OP, Devine KJ, Jones PW, Maguire AR: Desmethylobietospiran, a naturally occurring self-gelation agent. *J. Nat. Prod.* 2005; 68: 125-128.
26. Khare CP: Indian herbal remedies: rational Western therapy, ayurvedic and other traditional usage, botany, Springer, Berlin, 2004: 3.

27. Mravlje V: Analiza antioksidativnih spojin v skorji navadne smreke (*Picea abies* (L.) Karst.) in skorji navadne jelke (*Abies alba* Mill.), Diplomsko delo, Ljubljana, 2008.
28. Bošnjak D: Prodali patentno prijavo. Delo 2009; 209: 16.
29. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM: Drogen analyse, Springer, Berlin, 1983: 304-305.
30. Tattini M, Gravano E, Pinelli P, Mulinacci N, Romani A: Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. New Phytol. 2000; 148: 69-77.
31. Jork H, Funk W, Fischer W, Wimmer H: Thin-layer chromatography: reagents and detection methods. Vol. 1a, Physical and chemical detection methods: fundamentals, reagents I, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1990: 277-280.
32. Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2004; 26: 211-219.
33. <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/6/47641dat.Par.0001.File.tmp/47641dat.pdf> Datum dostopa: 20.12.2010
34. Prior RL, Wu X, Schaich K: Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J. Agric. Food Chem. 2005; 53: 4290-4302.
35. Kastelic J: Optimizacija izolacije proantocianidinov iz skorje navadne smreke (*Picea abies*, (L.) Karst.), Diplomsko delo, Ljubljana, 2008.
36. Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB: Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. J. Agric. Food Chem. 2010; 58: 8139-8144.
37. Waterhouse AL: Determination of total phenolics, Current protocols in food analytical chemistry, Wiley, New York, 2002: I1.1.1-I1.1.8.
38. Ikawa M, Schaper TD, Dollard CA, Sasner JJ: Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. J. Agric. Food Chem. 2003; 51: 1811-1815.
39. Lazarus SA, Kelm MA, Wächter GA, Hammerstone JF, Schmitz HH: Methods in polyphenol analysis, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2003: 48-62, 92-127, 275-276, 284-313.
40. Baderschneider B, Luthria D, Waterhouse A, Winterhalter P: Antioxidants in white wine (cv. Riesling): I. Comparison of different testing methods for antioxidant activity. Vitis 1999; 38: 127-131.

-
41. Sun B, Ricardo-da-Silva JM, Spranger I: Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46: 4267-4274.
42. Sarkar SK, Howarth RE: Specificity of the vanillin test for flavanols. *J. Agric. Food Chem.* 1976; 24: 317-320.
43. Schofield P, Mbugua DM, Pell AN: Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* 2001; 91: 21-40.
44. <http://www.chem.agilent.com/Library/Support/Documents/a05296.pdf> Datum dostopa: 28.1.2011
45. Makkar HPS, Siddhuraju P, Becker K: Plant secondary metabolites, Humana Press, Totowa, 2007: 96.
46. Četković GS, Đilas SM, Čanadanović-Brunet JM, Tumbas VT: Thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold (*Calendula officinalis* L.) extracts. *Acta Periodica Technologica* 2003; 34: 93-102.
47. Maas M, Petereit F, Hensel A: Caffeic acid derivatives from *Eupatorium perfoliatum* L.. *Molecules* 2009; 14: 36-45.
48. Flamini R, Traldi P: Mass spectrometry in grape and wine chemistry, Wiley, Hoboken, 2010: 11-24, 163-225.