

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA GROHAR

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA GROHAR

**SEPARACIJA IN IDENTIFIKACIJA FLAVONOIDOV V
POLIETILENGLIKOLNEM IZVLEČKU LUBJA NAVADNE JELKE (*ABIES
ALBA*)**

**SEPARATION AND IDENTIFICATION OF FLAVONOIDS IN SILVER FIR
BARK (*ABIES ALBA*) POLYETHYLENE GLYCOL EXTRACT**

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in delovnim mentorstvom Eve Tavčar, mag. farm. Del diplomskega dela, in sicer masno spektrometrijo smo izvajali na Inštitutu Jožef Stefan.

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in Evi Tavčar, mag. farm. za strokovno pomoč, usmerjanje in nasvete med delom v laboratoriju in pri izdelavi diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi dr. Dušanu Žigonu z Inštituta Jožef Stefan za pomoč pri izvedbi masne spektrometrije in vsem na Katedri za farmacevtsko biologijo za kakršnokoli pomoč. Zahvalila bi se tudi svojim staršem, bratu Mitju, fantu Petru, prijateljem in sošolcem, ki so mi med študijem stali ob strani in me podpirali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta.

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

Član komisije: doc. dr. Jožko Cesar, mag. farm.

Tina Grohar

Ljubljana, 2012

VSEBINA

1 UVOD	1
1.1 Borovke (<i>Pinaceae</i>)	1
1.2 Navadna jelka (<i>Abies alba Mill.</i>)	1
1.3 Lubje navadne jelke	2
1.4 Sestava lubja	2
1.5 Fenolne spojine	3
1.5.1 Fenolne kisline in njihovi derivati	3
1.5.2 Flavonoidi	4
1.5.3 Hidrolizirajoči tanini	5
1.5.4 Lignani	5
1.5.5 Stilbeni	6
1.5.6 Terpeni in terpenoidi	6
1.5.6.1 Monoterpeni	6
1.5.6.2 Seskviterpeni	7
1.5.6.3 Diterpeni	7
1.5.6.4 Triterpeni	7
1.5.6.5 Tetraterpeni	8
1.5.7 Maščobe in voski	8
2 NAMEN DELA.....	9
3 MATERIALI IN METODE	10
3.1 Rastlinski material	10
3.2 Topila	10
3.3 Reagenti	11
3.4 Aparature in oprema	12
4 METODE IN EKSPERIMENTALNO DELO	13
4.1 Analiza vzorcev izvlečkov lubja navadne jelke na prisotnost in vsebnost procianidinov po USP 35	13
4.1.1 Prisotnost procianidinov po USP 35 v različnih vzorcih izvlečkov lubja navadne jelke	13
4.1.2 Vsebnost procianidinov po USP 35 v različnih vzorcih izvlečkov navadne jelke in Pikkogenola	13
4.2 Izbira vzorca za uporabo pri metodah separacije in identifikacije	14

4.3 Metode separacije	14
4.3.1 Tiolizna degradacija procianidnih polimerov	14
4.3.2 Ekstrakcija.....	15
4.3.2.1 Zaporedna ekstrakcija PEG ABE.....	16
4.3.3 Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE)	16
4.3.4 Analizna in preparativna TLC	17
4.3.4.1 Analizna TLC.....	18
4.3.4.2 Preparativna TLC.....	19
4.3.4.2.1 Optimizacija koncentracije nanosa	19
4.3.4.2.2 Priprava preparativne TLC	19
4.3.5 'Flash' kolonska kromatografija	20
4.4 Analizna HPLC.....	21
4.5 Metode identifikacije	22
4.5.1 LC/MS.....	22
4.5.1.1 UPLC	23
4.5.1.2 MS.....	23
4.5.2 Določanje spojin s pomočjo standardov	24
4.5.3 Plinska kromatografija (GC).....	24
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	25
5.1 Analiza vzorcev izvlečkov lubja navadne jelke na prisotnost in vsebnost procianidinov po USP 35.....	25
5.2 Izbira vzorca za uporabo pri metodah separacije in identifikacije	27
5.3 Metode separacije	27
5.3.1 Tiolizna degradacija procianidnih polimerov	27
5.3.2 Zaporedna ekstrakcija PEG ABE.....	28
5.3.3 Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE)	34
5.3.4 Analizna in preparativna TLC	35
5.3.4.1 Analizna TLC.....	35
5.3.4.2 Preparativna TLC.....	37
5.3.4.3 Analizna HPLC.....	38
5.3.5 'Flash' kolonska kromatografija	39
5.4 Metoda identifikacije	42
5.4.1 LC/MS.....	42

5.4.1.1 Spojine A, D, E in I.....	42
5.4.1.1.1 Spojina A = taksiresinol.....	43
5.4.1.1.2 Spojina I = 7-(2-metil-3,4-dihidroksitetrahidropiran-5-iloksi)-taksiresinol	44
5.4.1.1.3 Spojina D = sekoizolariciresinol	45
5.4.1.1.4 Spojina E = lariciresinol	46
5.4.1.2 Spojine B, C, G, O, Š in U	47
5.4.1.2.1 Spojina B = p-kumarna kislina (3-(4-hidroksifenil)-2-propenojska kislina)	47
5.4.1.2.2 Spojina C = protokatehuska kislina (3,4-dihidroksibenzojska kislina)	48
5.4.1.2.3 Spojina G = galna kislina (3,4,5-trihidroksibenzojska kislina)	49
5.4.1.2.4 Spojina O = homovanilična kislina (2-(4-hidroksi-3-metoksibenzen)-ocetna kislina)	51
5.4.1.2.5 Spojina Š = vanilinska kislina (4-hidroksi-3-metoksibenzojska kislina)	52
5.4.1.2.6 Spojina U = p-hidroksibenzojska kislina	52
5.4.1.3 Spojine Č, H, J, K, S in T.....	53
5.4.1.3.1 Spojini H in J	53
5.4.1.3.2 Spojini S in T	54
5.4.1.3.3 Spojina Č = katehin tetrametil eter	55
5.4.1.3.4 Spojina K	56
5.4.1.4 Spojina Z.....	56
5.4.1.5 Spojine F, L, M, N, P, R in V	57
5.4.1.6 Ostale spojine.....	57
6 SKLEP.....	58
7 LITERATURA	60

SEZNAM SLIK

Slika 1: Navadna jelka (Abies alba Mill.) (4).....	1
Slika 2: Sestava debla jelke (8).....	2
Slika 3: Osnovna struktura flavonoidov (15)	4
Slika 4: Hidrolizirajoči tanini	5
Slika 5: Značilne strukture lignanov.....	5
Slika 6: Diarileten.....	6
Slika 7: Izopren.....	6
Slika 8: Razpad proantocianidinov za dokaz prisotnosti in vsebnosti (32).....	13
Slika 9: Tiolizna degradacija proantocianidinov (33)	15
Slika 10: Zbrane frakcije PEG izvlečka in suhega vodnega izvlečka	17
Slika 11: Reakcija med vanilinom in flavan-3-olom (37)	17
Slika 12: Primer primerjave vzorcev št. 3 in št. 4.....	27
Slika 13: Kromatogram PEG ABE pred tiolizo in po njej	27
Slika 14: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta s petroletrom	28
Slika 15: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta z dietiletrom	29
Slika 16: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta z 1-butanolom	29
Slika 17: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta z etilacetatom	29
Slika 18: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta z n-pentanom	29
Slika 19: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta z n-heptanom	30
Slika 20: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta s toluenom.....	30
Slika 21: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta s ksilenom	30
Slika 22: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta z diklorometanom	30
Slika 23: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta s kloroformom	31
Slika 24: Kromatogram ekstrakta z n-pentanom	31
Slika 25: Kromatogram ekstrakta z n-heptanom	31
Slika 26: Kromatogram ekstrakta s petroletrom	32
Slika 27: Prekrivanje kromatogramov ekstrakta z diklorometanom in ekstrakta s kloroformom	33
Slika 28: Primerjava SPE metanol:voda (1:1) + 2,5 % ocetne kisline in PEG ABE	35
Slika 29: Rezultat SPE metanol + 2,5% ocetne kisline	35
Slika 30: Rezultat SPE aceton:voda (1:1) + 2,5% ocetne kisline	35

Slika 31: MF(1)	35
Slika 32: MF(2)	35
Slika 33: MF(3)	36
Slika 34: MF(4)	36
Slika 35: MF(5)	36
Slika 36: MF(6)	36
Slika 37: MF(7)	36
Slika 38: Različne koncentracije nanosov	37
Slika 39: Različno število nanosov enake koncentracij.....	37
Slika 40: 1.–2. lisa vodni suhi izvleček, 3.–5. lisa PEG ABE od leve proti desni	37
Slika 41: Razvit in orošen preparativni TLC – lisa 1 PEG izvleček, lisa 2 vodni suhi izvleček	38
Slika 42: Odstranjen silikagel na mestu nastalih lis	38
Slika 43: Primerjava lise 1 in lise 2 na preparativni TLC	39
Slika 44: Primerjava lise 3 in 4 na preparativni TLC	39
Slika 45: Kromatogram PEG ABE.....	40
Slika 46: Optimizirana metoda za FR 21	40
Slika 47: Optimizirana metoda za FR 8	41
Slika 48: Optimizirana metoda za FR 17	41
Slika 49: Optimizirana metoda za FR 43	41
Slika 50: Optimizirana metoda za FR 37	42
Slika 51: Optimizirana metoda za FR 133	42
Slika 52: Masni spekter v ESI– in ESI+ spojine A	43
Slika 53: Struktura spojine A	43
Slika 54: UV-VIS spekter spojina A	43
Slika 55: Masni spekter v ESI– spojine I	44
Slika 56: Kromatogram z UV-VIS in masnim (ESI+) detektorjem frakcije 43	44
Slika 57: Struktura spojine I	44
Slika 58: UV-VIS spekter spojine I.....	45
Slika 59: Masni spekter v ESI– in ESI+ spojine D	45
Slika 60: Struktura spojine D	46
Slika 61: UV-VIS spekter spojine D	46
Slika 62: Masni spekter v ESI– in ESI+ spojine E.....	46

Slika 63: Struktura spojine E	47
Slika 64: UV-VIS spekter spojine E	47
Slika 65: Masni spekter v ESI– spojine B	47
Slika 66: Struktura spojine B	47
Slika 67: Primerjava kromatograma PEG ABE in kromatograma PEG ABE z dodatkom standarda p-kumarne kisline	48
Slika 68: UV-VIS spekter standarda p-kumarne kisline	48
Slika 69: UV-VIS spekter PEG ABE	48
Slika 70: Masni spekter v ESI– spojine C	48
Slika 71: Struktura spojine C	49
Slika 72: Primerjava kromatograma PEG ABE in kromatograma PEG ABE z dodatkom standarda protokatehuične kisline	49
Slika 73: UV-VIS spekter PEG ABE	49
Slika 74: UV-VIS spekter standarda proto- katehuične kisline	49
Slika 75: Masni spekter v ESI– spojine G	49
Slika 76: Struktura spojine G	50
Slika 77: Primerjava kromatograma PEG ABE in kromatograma PEG ABE z dodatkom standarda galne kisline	50
Slika 78: UV-VIS spekter PEG ABE	50
Slika 79: UV-VIS spekter standarda galne kisline	50
Slika 80: Masni spekter v ESI– spojine O	51
Slika 81: Struktura spojine O	51
Slika 82: UV-VIS spekter spojine O	51
Slika 83: Primerjava kromatograma PEG ABE in kromatograma PEG ABE z dodatkom standarda vanilinske kisline	52
Slika 84: UV-VIS spekter PEG ABE	52
Slika 85: UV-VIS spekter standarda vanilinske kisline	52
Slika 86: Struktura vanilne kisline	52
Slika 87: Masni spekter v ESI– spojine U	52
Slika 88: Struktura spojine U	53
Slika 89: Primerjava kromatograma PEG ABE in kromatograma PEG ABE z dodatkom standarda p-hidroksibenzojske kisline	53
Slika 90: UV-VIS spekter PEG ABE	53

Slika 91: UV-VIS spekter p-hidroksibenzojske kisline.....	53
Slika 92: UV-VIS spekter spojine H	54
Slika 93: UV-VIS spekter spojine J.....	54
Slika 94: Primerjava kromatograma PEG ABE in kromatograma PEG ABE z dodatkom standarda epikatechina	54
Slika 95: Primerjava kromatograma PEG ABE in kromatograma PEG ABE z dodatkom standarda epikatechina	54
Slika 96: Masni spekter v ESI– in ESI+ spojine Č	55
Slika 97: Struktura spojine Č.....	55
Slika 98: UV-VIS spekter spojine Č	55
Slika 99: Struktura spojine K	56
Slika 100: Masni spekter v ESI– spojine K.....	56
Slika 101: UV-VIS spekter spojine K	56
Slika 102: Struktura spojine Z.....	56
Slika 103: Masni spekter v ESI– in ESI+ spojine Z.....	57

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Sistematika vrste <i>Abies alba Mill.</i> (5)	2
Preglednica II: Vzorci, uporabljeni pri testu prisotnosti in vsebnosti po USP 35	10
Preglednica III: Mobilne faze, ki smo jih uporabili pri optimizaciji TLC-ja	18
Preglednica IV: Podatki nanašanja na preparativno TLC	19
Preglednica V: Vrstni red uporabljenih mobilnih faz.....	20
Preglednica VI: Pregled optimiziranih metod na HPLC in za nadaljnjo uporabo na MS ...	22
Preglednica VII: Preglednica pogojev, ki smo jih uporabili pri analizi LC/MS	23
Preglednica VIII: Rezultati identifikacijskega testa in testa vsebnosti vseh vzorcev.....	25
Preglednica IX: Izmerjene absorbance pred in po segrevanju	26
Preglednica X: Rezultati tiolizne degradacije procianidnih polimerov	28
Preglednica XI: Pregled izkoristka ekstrakta z n-pentanom v primerjavi s PEG ABE.....	31
Preglednica XII: Pregled izkoristka ekstrakta n-heptana v primerjavi s PEG ABE.....	32
Preglednica XIII: Pregled izkoristka ekstrakta s petroletrom v primerjavi s PEG ABE.....	32
Preglednica XIV: Pregled izkoristka ekstrakta s toluenom v primerjavi s PEG ABE	32
Preglednica XV: Pregled izkoristka ekstrakta s ksilenom v primerjavi s PEG ABE	33
Preglednica XVI: Pregled izkoristka ekstrakta z diklorometanom v primerjavi s PEG ABE	33
Preglednica XVII: Pregled izkoristka ekstrakta z dietiletrom v primerjavi s PEG ABE	34
Preglednica XVIII: Pregled izkoristka ekstrakta z 1-butanolom v primerjavi s PEG ABE	34
Preglednica XIX: Pregled izkoristka ekstrakta z etilacetatom v primerjavi s PEG ABE....	34
Preglednica XX: Izračun izgub pri izvedbi preparativne TLC	38
Preglednica XXI: Fragmenti spojine A v ESI– in ESI+.....	43
Preglednica XXII: Fragmenti spojine I v ESI–	44
Preglednica XXIII: Fragmenti spojine D v ESI– in ESI+	45
Preglednica XXIV: Fragmenti spojine E v ESI– in ESI+	46
Preglednica XXV: Fragmenti spojine B v ESI–.....	47
Preglednica XXVI: Fragmenti spojine C v ESI–	48
Preglednica XXVII: Fragmenti spojine G v ESI–.....	50
Preglednica XXVIII: Fragmenti spojine O v ESI–	51
Preglednica XXIX: Fragmenti spojine U v ESI–	52
Preglednica XXX: Fragmenti spojine Č v ESI–.....	55

Preglednica XXXI: Fragmenti spojine K v ESI–	56
Preglednica XXXII: Fragmenti spojine Z v ESI– in ESI+	57
Preglednica XXXIII: Preglednica spojin, identificiranih s pomočjo GC	57

POVZETEK

S kemijsko sestavo jelke so se raziskovalci ukvarjali v številnih raziskavah, vendar večina na drevesnem deblu, belini in črnjavi, na grčah in koreninah, zelo malo raziskav pa je bilo narejenih na lubju jelke. Pri raziskovanju izvlečka lubja navadne jelke (*Abies alba Mill.*) s polietilenglikolom je bil naš glavni namen ločiti in identificirati spojine, predvsem flavonoide, ki so jim v predhodnih raziskavah pripisali, da so nosilci antioksidativne aktivnosti.

Najprej smo ugotavljali prisotnost in vsebnost procianidinov v izvlečku, in sicer po postopku ameriške farmakopeje USP 35 za 'Maritime Pine Extract'. Prisotnost smo preverili tudi s tiolizno degradacijo procianidnih polimerov. Z ekstrakcijama tekoče-tekoče in trdno-tekoče in različnimi kromatografskimi metodami kot sta tankoplastna kromatografija in `flash` kolonska kromatografija smo iz kompleksnega izvlečka poskušali dobiti čim bolj ločene spojine. Dobljene frakcije smo vrednotili s pomočjo analize tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Za posamezne frakcije smo optimizirali kromatografske metode, kar je prispevalo k še dodatni separaciji spojin v posamezni frakciji. Optimizirane metode smo nato uporabili za analizo frakcij z masno spektrometrijo.

Iz dobljenih masnih molekulskih vrhov in fragmentov spojin smo sklepali o strukturi spojine. Pričakovali smo strukture flavonoidov, vendar smo kot prevladujoče spojine v izvlečku identificirali lignane. Izstopala sta taksiresinol in derivat taksiresinola: 7-(2-metil-3,4-dihidroksitetrahidropiran-5-iloksi)taksiresinol, za katera v literaturi nismo zasledili, da bi bila njuna prisotnost v navadni jelki že ugotovljena. Identificirali smo tudi sekoizolariciresinol in lariciresinol. Poleg lignanov smo identificirali flavonoide (catehin, epicatehin in derivat catehina, catehin tetrametil eter, ki ga ravno tako še nismo zasledili v literaturi) in fenolne kisline (p-kumarna, protokatehajska, vanilinska, homovanilična, p-hidroksibenzojska in galna). Identiteto nekaterih spojin smo preverjali tudi s primerjavo retencijskih časov standardov (catehin, epicatehin, p-kumarna, protokatehajska, vanilinska, p-hidroksibenzojska in galna kislina). Prisotnost vanilinske in homovanilične kisline smo potrdili tudi z rezultati pridobljenimi s plinsko kromatografijo, ki je nismo izvajali v okviru diplomskega dela.

Z našimi rezultati smo uspešno prispevali k poznavanju spojin v polietilenglikolnem izvlečku lubja navadne jelke (*Abies alba Mill.*).

ABSTRACT

Chemical composition of the silver fir has been the subject of many scientific researches, focusing mainly on its trunk, sapwood, heartwood, knots and roots, while the bark of the silver fir has been relatively neglected. In studying polyethylene glycol extract from the bark of the silver fir (*Abies alba Mill*), our primary objective was to separate and identify the compounds, mainly flavonoids which in the previous researches were said to be the bearers of antioxidant activities.

First we examined the presence and the contents of procyanidins in the extract, using the method of American pharmacopoeia USP 35 for "Maritime Pine Extract". In addition, we checked the presence by means of thiolytic degradation of procyanidin polymers. By means of liquid-liquid and solid-liquid extractions as well as various chromatographic methods like thin layer chromatography and »flash« column chromatography, we tried to get as much separated compounds as possible from the complex extract. We evaluated the obtained fractions by means of the analysis of high resolution liquid chromatography. We optimised chromatographic methods for individual fractions, which contributed to the additional separation of the compounds in each fraction. Optimised methods were then used also for the analysis of the fractions with mass spectrometry.

We drew our conclusions about the structure of the compound from the acquired mass molecular ion peaks and from the fragments of the compounds. We had expected flavonoid structures; however, it was lignans that we identified as the predominant compounds in the extract. Among them prevailed taxiresinol and a derivate of taxiresinol: 7-(2-methyl-3,4-dihydroxytetrahydropyran-5-yloxy)taxiresinol which, according to the accessible literature, has not been found in the silver fir before. We also identified secoisolariciresinol and lariciresinol. Beside lignans, we found flavonoids (catechin, epicatechin and a derivative of catechin: catechin- tetramethyl ether which has not so far been mentioned in the literature either) and phenolic acids (p-coumaric, protocatechuic, vanillic, homovanillic, p-hydroxybenzoic and gallic). In addition, we checked the identity of some compounds by comparing their retention time standards (catechin, epicatechin, p-coumaric, protocatechuic, vanillic, p-hydroxybenzoic and gallic acids). The presence of vanillic and homovanillic acids was proved also by the results gained by gas chromatography, not being performed within the frames of my research.

The acquired results have substantially and successfully contributed to the knowledge about the compounds in the polyethylene glycol extract from the bark of the silver fir.

SEZNAM OKRAJŠAV

ABE – (*ang. Abies alba bark extract*) ekstrakt lubja jelke

ESI – (*ang. electrospray ionisation*) vir ionizacije z razprševanjem raztopin v električnem polju

EtOAc – etilacetat

FFA – Fakulteta za farmacijo

GC – (*ang. gas chromatography*) plinska kromatografija

HPLC – (*ang. high performance liquid chromatography*) tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

LC – (*ang. liquid chromatography*) tekočinska kromatografija

MS – (*ang. mass spectrometry*) masna spektrometrija

PEG – polietilenglikol

RP – (*ang. reverse – phase*) reverznofazen

Rt – (*ang. retention time*) retencijski čas

SPE – (*ang. solid phase extraction*) trdnofazna ekstrakcija

TFA – trifluorocetna kislina

TG – trigliceridi

TLC – (*ang. thin layer chromatography*) tankoplastna kromatografija

UPLC – (*ang. ultra performance liquid chromatography*) ultra zmogljiva tekočinska kromatografija

1 UVOD

1.1 Borovke (*Pinaceae*)

Družina borovk (*Pinaceae*) pripada redu iglavcev, ki so iglaste golosemenke. V to družino spadata tudi navadna jelka (*Abies alba Mill.*) in obmorski bor (*Pinus maritima Mill.*). Raziskovalci so iz lubja obmorskega bora pridobili ekstrakt, ki ima po raziskavah močan antioksidativni učinek. Ekstrakt vsebuje fenolne spojine kot glavne sestavine (1). Raziskave so bile narejene tudi na lubju drugih vrst bora. Njihova kemijska zgradba je podobna, razlikujejo pa se po količini in razmerju spojin. Podobne zmesi fenolnih spojin so prisotne tudi v drugih vrstah iglavcev, ki imajo podoben oz. večji antioksidativni učinek (2).

1.2 Navadna jelka (*Abies alba Mill.*)

Navadna jelka (*Abies alba Mill.*) spada v družino borovk (*Pinaceae*). Njena sistematika je prikazana v preglednici I. Jelko najlažje prepoznamo po dveh srebrno-belih črtah na spodnji strani iglic. V višino zraste od 40 do 50 m in več ter doseže visoko starost tudi do 600 let. Raste v srednji Evropi in njenem južnem predelu. Opredeljena je kot podnebno občutljiva vrsta, saj ne prenese visokih poletnih in nizkih zimskih temperatur. Višinsko jelka zavzema pas od 100 do 2000 m. Ima širok ekološki razpon, saj lahko raste na sušnih in mokrih tleh. Razširjenost omejujeta suša na jugu in manjša vlažnost na severu in vzhodu. V Sloveniji je jedro razširjenosti jelke odvisno od območja razširjenosti jelovo-



Slika 1: Navadna jelka (*Abies alba Mill.*) (4)

bukove združbe (*Abieti-Fagetum dinaricum*). Jelko ogrožajo naravne ujme, na njeno vitalnost pa vplivajo tudi druge rastline, s katerimi si deli prostor in jelenjad z objedanjem poganjkov. Navsezadnje pa jo ogroža tudi človek s svojimi posegi v gozd, saj s tem spreminja njegovo sestavo in strukturo. Ker pa narava vedno poskrbi za regeneracijo, najdemo pri zaraščanju nekdanjih goličav tudi jelko (3).

Preglednica I: Sistematika vrste *Abies alba* Mill. (5)

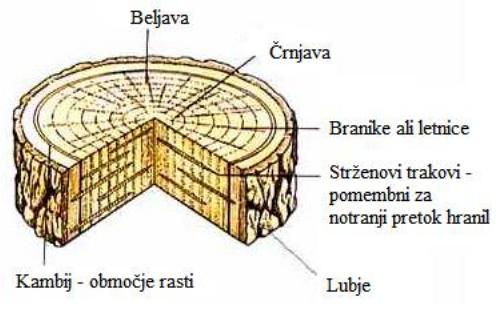
kraljestvo	Plantae	rastline
deblo	<i>Spermatophyta</i>	semenke
poddeblo	<i>Coniferophyta</i>	igličastolistne golosemnke
razred	<i>Pinopsida</i>	/
podrazred	<i>Pinidae</i>	storžnjaki
Red	<i>Pinales</i>	/
družina	<i>Pinaceae</i>	borovke
Rod	<i>Abies</i>	jelka
vrsta	<i>A. alba</i>	navadna (bela) jelka

1.3 Lubje navadne jelke

Lubje je izolacijska plast notranjim živim in občutljivim tkivom ličja in kambija. Varuje jih pred zunanjimi abiotskimi (voda, zrak, svetloba, toplota, mineralne snovi) in biotskimi dejavniki (rastline, živali, mikroorganizmi, človek) (6). Delež lubja variira glede na starost, geografsko lego in višino drevesa. Pri navadni jelki, ki uspeva v Sloveniji, predstavlja delež lubja od 10 do 12 % hloda (7).

1.4 Sestava lubja

Meja med lesom (ksilem) in lubjem je kambij (glej sliko 2). Ta živa plast celic proizvaja ksilemske celice proti notranjosti debla in floemske celice proti zunanji strani. Lubje je sestavljeno iz več tkiv. Deli se na zunanje, mrtvo lubje ali ritidomo, in na notranje, živo lubje ali floem. Ločeni sta s tanko plastjo, peridermom. Ritidoma se ne more širiti pri debelinski rasti debla, zato razpoka in se lušči. Periderm sestavlja tri plasti: felem (pluta), felogen (plutni kambij) in feloderm. Plutaste celice vsebujejo voskasto snov suberin ter preprečujejo penetracijo vode in zraka v notranjost. Odmrejo kmalu po nastanku in se nato napolnijo z zrakom. Za tem odmre tudi tkivo, izolirano od floema. Floem je podobno kot les sestavljen iz prevodnih, sklerenhimskih in parenhimskih celic. Predvsem lubje iglavcev vsebuje tudi smolne kanale, ki so medcelični prostori, napolnjeni s smolo. Kemijska zgradba lubja je komplikirana. Variira glede na drevesno vrsto in



Slika 2: Sestava debla jelke (8)

morfološke elemente, ki jih vsebuje. Mnogo komponent lesa kot so ogljikovi hidrati, vosek, lignin, suberin, terpenoidi, polifenoli in njihovi glikozidi ter čreslovine, se pojavlja tudi v lubju, čeprav v različnih razmerjih. Tipična za lubje je visoka količina nekaterih topnih sestavin (ekstraktivnih snovi) kot so fenolne spojine, terpeni in terpenoidi, maščobe in voski. V lubju so prisotni tudi ogljikovi hidrati (celuloza, hemiceluloza, polisaharidi, pektin, škrob) in lignin. Delež celuloze in hemiceluloze, ki delno sestavlja celično steno lubja, je bistveno manjši kot pri lesu. V zunanjem delu lubja je veliko lignina, ki daje skorji trdnost in krhkost. Prisotne so tudi anorganske snovi, ki so potrebne za rast drevesa in jih skorja vsebuje več kot les. Prevladujoči element je kalcij, sledijo pa mu kalij, magnezij, silicij, natrij, mangan in drugi. Po popolnem sežigu lesa mineralne snovi ostanejo v obliki pepela. V primeru sežiga lubja ga nastane več kot 10 % (9, 10, 11).

Ekstraktivne spojine so poznane tudi pod izrazom akcesorne snovi. Te snovi niso glavni sestavni del celične stene in jih lahko ekstrahiramo z nevtralnimi topili. Kljub temu se s topili ekstrahira tudi del lignina, ne ekstrahirajo pa se mineralne snovi, ki so ravno tako del akcesornih snovi. Te snovi imajo največji pomen pri naravni odpornosti lesa, ki je odvisna tudi od anatomske zgradbe. Sladkorji, škrob in beljakovine pospešujejo napade škodljivcev. Smole, tanini, pigmenti, pektini, alkaloidi, glikozidi in fenoli pa zavirajo ali preprečujejo ogroženost pred škodljivci. Bogat vir ekstraktivnih spojin so korenine in lubje (9, 12).

1.5 Fenolne spojine

Fenolne spojine imajo v svoji strukturi vsaj en aromatski obroč in nanj vezano eno ali več hidroksilnih skupin. Fenolne spojine, ki imajo več hidroksilnih skupin, imenujemo tudi polifenoli. V drevesnih vrstah se nahajajo predvsem v skorji in črnjavi, le sledovi so prisotni v ksilemu. Te spojine imajo fungicidno delovanje in ščitijo pred mikrobi. Obenem povzročajo obarvanost lesa. Pri ekstrahiranju fenolov se izkaže, da ekstrakti vsebujejo veliko fenolov z nizkimi molekulskimi masami, ki so po vsej verjetnosti razpadni produkti večjih spojin, ki med postopkom ekstrakcije in čiščenja vzorca razпадajo (9).

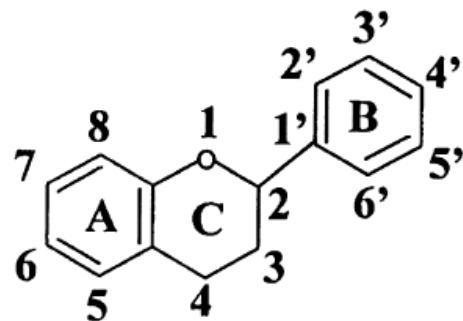
1.5.1 Fenolne kisline in njihovi derivati

Nizkomolekularne alifatske in fenolne kisline morda nimajo biološkega pomena in so prisotne le kot intermediati, morda ščitijo drevo pred mikrobi ali pa imajo vpliv na aktivnost rastlinskih hormonov. Derivate cimetne kisline vsebujejo celične stene večine

rastlin. V izvlečkih kritosemenk, dobljenih s hidrolizo celičnih sten z natrijevim hidroksidom, prevladujeta dva derivata cimetne kisline, p-kumarna in ferulna kislina, poleg njiju pa je moč zaslediti še sinapilno kislino in različne derivate benzojske kisline ter benzaldehida, predvsem p-hidroksibenzojsko, 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzojsko in vanilinsko kislino, p-hidroksibenzaldehid, 4-hidroksi-3,5-dimetoksi-benzaldehid in vanilin. Derivati benzojske kisline in benzaldehida naj bi bili količinsko manj pomembni. Raziskovalci Univerze v Padovi so preučevali vpliv nizkomolekularnih alifatskih kislin (oksalne, vinske, jabolčne, malonske, jantarjeve in fumarne) ter fenolnih kislin (protokatehajske, p-kumarne, benzojske, hidroksibenzojske, vanilinske in fenilocetne kisline), katehola, protokatehajskega aldehida in vanilina v topnem organskem delu prsti na rast sadik navadne jelke in bukve, ki naj bi jih ti dve tudi vsebovali. Njihova različna vsebnost vpliva na vrsto vegetacijske združbe. V bukovih gozdovih je v topnem organskem delu prsti visoka vsebnost fenolnih kislin, na kar vpliva hiter razkroj organskih snovi. V jelovih gozdovih poteka počasen razkroj organskih snovi. V topnem organskem delu jelovih gozdov je visoka vsebnost alifatskih kislin (13, 14).

1.5.2 Flavonoidi

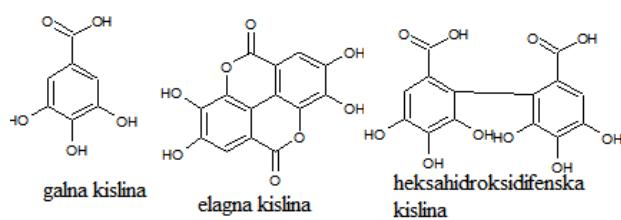
Flavonoidi so polifenoli s $C_6C_3C_6$ ogrodjem. Strukturno jih delimo glede na vrsto obroča C na flavone, flavanole, flavanone, flanonole, izoflavone in antocianidine. Flavonoidi so benzo- γ -piranski derivati, sestavljeni iz fenolnih in piranskih obročev. Med seboj se razlikujejo po razporeditvi in številu hidroksi, metoksi in glikozidnih skupin ter v konjugaciji med A in B obročem. Primarno flavonoidi obstajajo kot 3-O-glikozidi in polimeri. Njihove polimere imenujemo kondenzirajoči tanini ali proantocianidini. Glavni komponenti kondenzirajočih taninov sta flavan-3-ol in flavan-3,4-diol. V največjih količinah se nahajajo v drevesni skorji oz. lubju, iz česar jih tudi pridobivamo (9, 15). V koreninah navadne jelke so identificirali topna flavanola katehin in epikatehin, proantocianidina dimerni katehin in/ali epikatehin ter dihidroflavonolni glikozid taksonol-3'-O-glukopiranozid. Prisotnost (epi)catehina in njunih dimerov je bila potrjena tudi v lubju navadne jelke (13, 16).



Slika 3: Osnovna struktura flavonoidov (15)

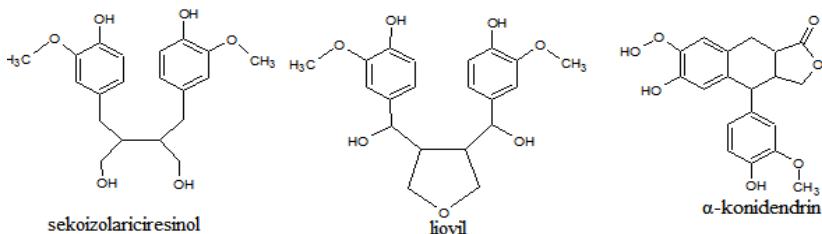
1.5.3 Hidrolizirajoči tanini

Hidrolizirajoči tanini so estri galne, heksahidroksidifenske in elagne kisline z monosaharidi, najpogosteje z glukozo. S hidrolizo ob prisotnosti kislin, baz ali encimov esteraz razpadajo na sladkorje in fenolne kisline. Galotanini in elagotanini so značilno prisotni tudi v iglavcih (9).



Slika 4: Hidrolizirajoči tanini

1.5.4 Lignani

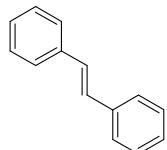


Slika 5: Značilne strukture lignanov

Lignani nastanejo s povezavo dveh C₆C₃ enot. Kot dimeri fenilpropanskih enot se pojavljajo tudi v ligninski strukturi. Mnogi, ki so že identificirani v ekstraktih drevesnih vrst, vsebujejo tudi tetrahidrofuranski obroč. Možne so tudi enostavne β-β vezi med dvema enotama in povezava med mestom 6 in obročem. Slika 5 prikazuje različne možne strukture lignanov (9). Več fenilpropanskih enot tvori oligolignane. Delimo jih na seskvineolignane (3 fenilpropanske enote), dineolignane (4 fenilpropanske enote) in višje lignane. Lignane ekstrahiramo s polarnimi topili. So naravni antioksidanti in imajo antimikrobni učinek. V lesu navadne jelke je največ sekoizolariciresinola, poleg tega pa so finski raziskovalci dokazali še prisotnost 7-hidroksimatairesinola, 7-alo-hidroksimatairesinola, liovila, lariciresinola, matairesinola, ciklolariciresinola, pinoresinola, lignana A in todolaktola. Navadna jelka je edina iz rodu *Abies*, ki vsebuje mono- in dimetil estre sekoizolariciresinola. V lesu navadne jelke pa niso našli α-konidendrina, α-konidendrinske kisline in lignana A, ki so prisotni v ostalih vrstah iz rodu *Abies*. Dokazali so tudi prisotnost oligolignanov (17, 18).

1.5.5 Stilbeni

Stilbeni so diarileteni in vsebujejo konjugirane dvojne vezi. Zato so izredno reaktivne spojine. Njihovo prisotnost v skorji iglavcev so odkrili že v 60-ih letih.

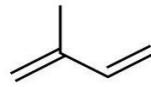


V koreninah navadne jelke so raziskovalci z Inštituta za rastlinsko biokemijo v Weinbergu dokazali prisotnost dveh glikozidov, in sicer astringina in izohapontina (19).

Slika 6: Diarileten

1.5.6 Terpeni in terpenoidi

Osnovna enota terpenov je ogljikovodik izopren C_5H_8 . Vendar v naravi terpeni ne nastanejo direktno iz izoprena, pač pa je osnova izopentenol.



Terpene delimo glede na število izoprenskih enot. To so monoterpeni (2 enoti), seskviterpeni (3 enote), diterpeni (4 enote), triterpeni (6 enot) in tetraterpeni (8 enot). Po zgradbi pa ločimo aciklične, ki nimajo vezanih atomov v obroče, monociklične, biciklične in triciklične terpene. Oleoresin navadne jelke, torej smola, ki jo izločajo epitelne celice, s katerimi so obloženi smolni kanali, je sestavljen iz smolnih kislin oz. terpenov, največ je monoterpenov in estrov maščobnih kislin. Na količinsko sestavo terpenov imata velik vpliv okolje in genetika. Posebnost navadne jelke je v nizki vsebnosti kisik-vsebujočih monoterpenov in seskviterpenov vrste bisabolen (9, 20).

1.5.6.1 Monoterpeni

Monoterpeni so hlapne snovi in so prijetnega vonja. Uporablja se v industriji parfumov in dišav. Nekateri služijo kot zdravila. Uporablja se za preprečevanje nastajanja žolčnih kamnov in vnetja žolčnika (pinen, kampfen, cineol, menton, mentol, borneol), vnetja mišic (mentol), za ublažitev vnetja žrela in zamašenega nosu (timol, mentol) ter za gastroezofagealno refluksno bolezen in zgago (limonen) (21, 22, 23, 24). Večina znanih monoterpenov je po zgradbi cikličnih. Njihova sinteza izhaja iz odprte verige. Delimo jih na monociklične in biciklične, obstajajo pa tudi aciklični monoterpeni. V oleoresinu navadne jelke je prisotnega največ limonena in α -pinena, sledijo še β -pinen, Δ -3-karen, β -fenaldren, β -mircen ter v sledeh kamfen, triciklen, α -fenen in terpinolen. Za navadno jelko so značilni tudi kisik-vsebujoči monoterpeni: borneol, kafra, bornil acetat in α -terpineol ter v sledeh α -terpenil acetat, linalil acetat, sabinen hidrat in timol metil eter za razliko od kavkaške jelke (*Abies nordmanniana*), kjer teh spojih ni (20).

1.5.6.2 Seskviterpeni

Sestavljeni so iz treh izoprenskih enot, ki se med seboj povezujejo v odprte verige ali pa v monociklične, biciklične ali triciklične strukture (9). V oleoresinu navadne jekle je bila ugotovljena prisotnost α -longipinena, longifolena, kariofilena, epikariofilena, kariofilen oksida, β -bisabolena, α - in γ -humulena, β -farnesena, humula-4,9-dien-8-ola, α - in β -himakalena, himakalola, himakal-2,4-diena, himakal-3(12),4-diena, kubebola, 4-epikubebola, (4S, 5S, 10S)-selin-6-en-4-ola, sibirena, α -kopaena in longiciklena. Izkazalo se je, da so seskviterpeni zelo nestabilni, saj so imeli raziskovalci težave z dokazovanjem (20, 25). V lesu navadne jelke so finski raziskovalci dokazali tudi prisotnost juvabionov. To so aciklični seskviterpeni in sekviterpenske kisline. Delujejo insekticidno in antifungistatično. Dokazali so naslednje: 4-dehidrojuvabion, todomatično kislino, 4-dehidrotodomatično kislino in atlanton (17).

1.5.6.3 Diterpeni

Diterpene sestavljajo štiri izoprenske enote. Najpomembnejši diterpeni pri iglavcih so smolne kisline, katerih osnovna enota je fenantrenška struktura z empirično formulo C₂₀H₃₀O₂. Med procesom pridobivanja se lahko izomerizirajo. V navadni jelki so ruski in kitajski raziskovalci dokazali prisotnost 13-epimanoola, dehidroabietana, cis-abienola, izocembrola, abietadiena in izopimaradiena (9, 25, 26).

1.5.6.4 Triterpeni

Triterpeni so zgrajeni iz šestih izoprenskih enot, povezanih v aciklične in ciklične spojine. Najpomembnejši so steroidi. Aciklični skvalen je predhodnik cikličnih triterpenov in ga najdemo v majhnih količinah v lesu iglavcev. Glavna komponenta steroidne skupine iglavcev je β -sitosterol. Večina triterpenov in sterolov je zaestrenih z maščobnimi kislinami (9). V navadni jelki so ruski in kitajski raziskovalci dokazali abiesonatno kislino, abietospiran, metilabiesolidat, dimetilabiesonat, ciklograndisolid, epiciklograndisolid, 3 α -hidroksilanost-9(11)-en-26,33-olid, β -sitosterol in kampesterol. S kislinsko frakcijo oleoresina navadne jelke so izolirali dve 3,4-sekotriterpenski kislini: (25R)-23-okso-3,4-seko-9 β -lanosta-4(28),7-dien-3,26-diojsko kislino in (25R)-23-okso-3,4-sekoabiesa-4(28),7,14(30)-trien-3,26-diojsko kislino (25, 27).

1.5.6.5 Tetraterpeni

Tetraterpeni so sestavljeni iz osmih izoprenskih enot in jih imenujemo tudi karoten. Zelo so razširjeni v rastlinskem in živalskem svetu. So rumeni, oranžni in rdeči pigmenti. Njihova barva je odvisna od števila konjugiranih dvojih vezi (9). Njihova prisotnost v navadni jelki še ni bila raziskana.

1.5.7 Maščobe in voski

Maščobe so estri višjih maščobnih kislin z glicerolom. Voski so estri maščobnih kislin z višjimi alkoholi. Med maščobami prevladujejo triglyceridi. Maščobe najdemo v parenhimskih celicah lubja. Poleg maščob in voskov so v lesu tudi proste maščobne kisline in alkoholi. Iz lesa jih lahko ekstrahiramo z organskimi topili. V semenih iglavcev vključno s semeni navadne jelke so prisotne neobičajne, dodatno $\Delta 5$ -nenasičene maščobne kisline v TG, ki jih poleg $\Delta 6(9)$ -nenasičenih maščobnih kislin vsebuje polovica identificiranih trigliceridov. Semena iglavcev vsebujejo največ taksoleinske, pinolenske, keteleronske in sciadojske kisline. TG pa poleg drugih vsebujejo še palmitinsko, stearinsko, oleinsko, linolensko, arahidonsko, gadoleinsko, behenično in lignocerinsko kislino. Voskasta snov suberin iz plutastih celic je polimer različnih α -hidroksi, α,ω -diojskih alifatskih kislin in fenolnih kislin (hidroksicimetne kisline in derivatov) (9, 28, 29).

2 NAMEN DELA

Polietilenglikolni izvleček lubja navadne jelke vsebuje fenole in druge snovi ter deluje antioksidativno. Namen našega dela bosta separacija in identifikacija v njem prisotnih spojin, predvsem flavonoidov, ki so jim v predhodnih raziskavah pripisali, da so nosilci antioksidativne aktivnosti izvlečka.

S predhodno razvito HPLC metodo bomo vrednotili vse v diplomskem delu obravnavane in pridobljene vzorce tako, da bomo med seboj primerjali njihove kromatograme. Iskali bomo najboljša načina separacije in identifikacije spojin v različnih ekstraktih. Najprej bomo preverili prisotnost in vsebnost procianidinov po USP 35 v različnih ekstraktih lubja jelke (30). Izvedli bomo tiolizno degradacijo za ugotavljanje vsebnosti procianidnih polimerov. Frakcijacijo vzorcev bomo pričeli z zaporednimi tekočinskimi ekstrakcijami s topili različnih polarnosti in ugotavliali njihovo selektivnost pri ekstrakciji spojin. Poskuse separacije bomo nadaljevali z uporabo tankoplastne in `flash` kolonske kromatografije ter ekstrakcije na trdnih nosilcih.

Z izbrano metodo separacije bomo pridobili frakcije ter za vsako posebej optimizirali HPLC metodo. Optimizirane metode bomo uporabili pri izvajaju tekočinske kromatografije z masno spektrometrijo (LC/MS). Iz dobljenih masnih spektrov bomo ugotavliali možne strukture spojin v posameznem vzorcu. Prisotnost določenih spojin bomo preverili s primerjavo HPLC kromatogramov vzorcev z dodanimi standardi in brez njih, če nam bodo standardi na voljo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Rastlinski material

Preglednica II: Vzorci, uporabljeni pri testu prisotnosti in vsebnosti po USP 35

Oznaka vzorca	Vzorec	Proizvodnja/priprava vzorca	Opis vzorca
1	PEG ABE	Pripravljen je na isti način kot drugi PEG izvlečki, le da je bil začetni vodni izvleček pripravljen z razapljanjem suhega vodnega izvlečka, ki je pol leta stal v suhi obliki.	1. industrijska serija, brez usedline
2			2. industrijska serija, prisotna gosta usedlina, ki se ne meša
3			3. industrijska serija, prisotna gosta usedlina, ki se ne meša
4		Vodni izvleček uprašenega lubja so ekstrahirali s protitočno ekstrakcijo z EtOAc. V regeneracijsko posodo so EtOAc izvlečku dodali PEG 400. EtOAc so iz mešanice odstranili z industrijskim vakuumom.	isti vzorec kot prozorni, dodatno odparevanje pod znižanim tlakom
5			isti vzorec kot prozorni, dodatno z industrijskim vakuumom odstranjen EtOAc
6			isti vzorec kot prozorni, odstranjen EtOAc v laboratoriju
7			isti vzorec kot prozorni
8	suhi patentni	FFA: pripravljen po patentnem postopku	hranjen v hladilniku
9	suhi vodni	Postrgan je bil s površine sicer prazne vreče. V drugi vreči, kjer je bil hranjen v večji količini, je iz njega nastal lepljiv trd kamen.	suhi vodni izvleček v obliki sprjetega prahu
10	Piknogenol	/	liofiliziran suhi izvleček, hranjen v hladilniku (Frenchmaritimine bark extr, Biolandes, F0400/Pycnogenol® V/REF: 06-11-04 N/REF: BP86633 LOT: G/1480 DLUO: 21 JUN 09)
11	usedlina suhi vodni	Filtrirali smo osnovno metanolno raztopino 'suhu vodni'. Iz posušenega filtrata smo pripravili novo osnovno raztopino v acetonu:vodi (60:40).	usedlina, nastala po razapljanju vzorca 'suhu vodni' v metanolu
12	usedlina Piknogenola	Filtrirali smo osnovno metanolno raztopino 'Piknogenol'. Iz posušenega filtrata smo pripravili novo osnovno raztopino v acetonu:vodi (60:40).	usedlina, nastala po razapljanju vzorca 'Piknogenol' v metanolu

3.2 Topila

Pri eksperimentalnem delu diplomskega dela smo uporabili naslednja topila:

- 1-butanol (Riedel-de Haën; Seelze, Nemčija)
- aceton (Panreac; Barcelona, Španija)
- acetonitril (Merck; Darmstadt, Nemčija)

- acetonitril HPLC (Panreac; Barcelona, Španija)
- cikloheksan (Riedel-de Haen; Seelze, Nemčija)
- dietileter (Riedel-de Haen; Seelze, Nemčija)
- diklorometan (J.T. Baker; Deventer, Nizozemska)
- etanol, 96 % (Panreac; Barcelona, Španija)
- etilacetat (Panreac; Barcelona, Španija)
- kloroform (Merck; Darmstadt, Nemčija)
- klorovodikova kislina, 37 % (Merck; Darmstadt, Nemčija)
- ksilen (Riedel-de Haen; Seelze, Nemčija)
- metanol (Carlo Erba; Milano, Italija, Panreac; Barcelona, Španija)
- mravljična kislina (Fluka; Buchs, Švica)
- n-heptan (Carlo Erba; Milano, Italija)
- n-pentan (Merck; Darmstadt, Nemčija)
- ocetna kislina (Merck; Darmstadt, Nemčija)
- petroleter (Panreac; Barcelona, Španija)
- prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani)
- toluen (Riedel-de Haen; Seelze, Nemčija)
- trifluorocetna kislina (Roth; Karlsruhe, Nemčija)
- voda HPLC (Panreac; Barcelona, Španija)

3.3 Reagenti

Pri eksperimentalnem delu diplomskega dela smo uporabili naslednje reagente:

- (–) epikatehin (Janssen Chimica; Beerse, Belgija)
- (+) katehin (Serva Feinbiochemica; Heidelberg, Nemčija)
- cisteaminijev klorid (Fluka; Buchs, Švica)
- galna kislina (Fluka; Buchs, Švica)
- PEG 400 (Serva Feinbiochemica; Heidelberg Nemčija)
- p-hidroksibenzojska kislina (Sigma-Aldrich; Steinheim, Nemčija)
- p-kumarna kislina (Sigma-Aldrich; Steinheim, Nemčija)
- protokatehajska kislina (Sigma-Aldrich; Steinheim, Nemčija)
- vanilin (Fluka; Buchs, Švica)
- vanilinska kislina (Sigma-Aldrich; Steinheim, Nemčija)

- amonijev železo (III) sulfat (Kemika; Zagreb, Jugoslavija)

3.4 Aparature in oprema

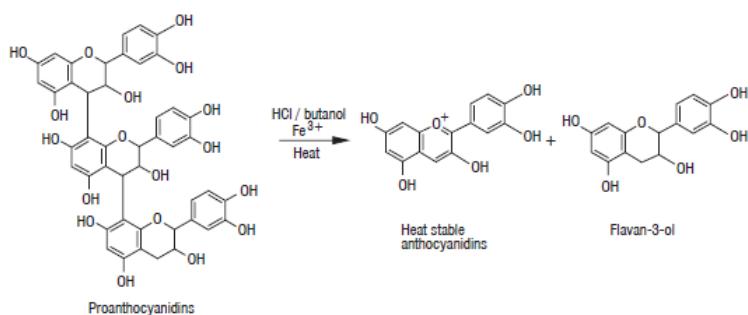
Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili naslednje aparature in opremo:

- centrifuga: Tehnica Centric 200R
- `flash`: Büchi Fraction Collector C-660 – Silicagel 60, Merck; kolona 40 x 150 mm, steklene epruvete: 10ml
- grelna plošča: Camag TLC plate heater III
- HPLC: HPLC Shimadzu Corporation, Japonska – sistem UFCL XR Shimadzu 20ADXR, detektor Diode Array SPD-M20A, računalniški program LC Solution Shimadzu 1.24 SP1, kolona Phenomenex Kinetex RP18 (10 cm x 4,6 mm, 2,7 µm)
- linomat: Camag Linomat IV
- LC/MS: Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA), masni spektrometer Q-ToF Premier (Waters/Micromass, Manchester, Velika Britanija) – detektor Diode Array, računalniški program MassLynx 4.1 SCN639, kolona Phenomenex Kinetex RP18 (10 cm x 4,6 mm, 2,7 µm)
- mešalo/stresalnik: Tehnica Vibromix 40
- rotavapor: Büchi rotavapor R – 200, Büchi rotavapor R – 114
- SPE kolona: Supelco Belleforte, Superclean LC-18, 3ml
- spektrofotometer: Lambda Bio+, Perkin Elmer
- tehtnice: analizna tehtnica Kern ALS 120 – 4, tehtnica Mettler PC 2000
- TLC kadička: Camag
- TLC kapilare: 10 µL, BRAND
- TLC plošče: TLC Silicagel 60, F₂₅₄, Merck; PLC Silicagel 60, 2 mm; TLC cellulose, F₂₅₄, Merck
- ultrazvočna kadička: Bandelin Sonorex Digitec
- UV svetilka: Camag UV-cabinet II
- vodna kopel: GFL, Nemčija
- drugo: injekcijske brizge 5 ml, injekcijske igle, steklene viale 2 ml, plastične epruvete 1,5 ml in 2 ml, mikrofilter za injekcijske brizge 0,2 µl, plastične (50 ml) in steklene epruvete (10ml), erlenmajerice, bučke, čaše, steklene palčke, čolnički, polavtomatske in steklene pipete, meritni valji, lij ločnik

4 METODE IN EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Analiza vzorcev izvlečkov lubja navadne jelke na prisotnost in vsebnost procianidinov po USP 35

Analizo smo izvedli po postopku ameriške farmakopeje USP 35 za 'Maritime Pine Extract' (30). Uporabili smo vzorce iz preglednice II. Metodo, količino izhodnih spojin, topil in potrebno laboratorijsko opremo smo prilagodili našim vzorcem in laboratorijskim razmeram. Proantocianidini v alkoholni raztopini pod močno kislimi pogoji s segrevanjem razpadajo z oksidativno razgradnjo interflavanskih vezi na antocianidine, ki absorbirajo vidno svetlobo roza barve. Železovi ioni s kelacijo OH skupin dodatno prispevajo k večji absorbciiji, s tem povečajo občutljivost in posredno ponovljivost metode (31). Vsebnost proantocianidinov določamo kolorimetrično.



Slika 8: Razpad proantocianidinov za dokaz prisotnosti in vsebnosti (32)

4.1.1 Prisotnost procianidinov po USP 35 v različnih vzorcih izvlečkov lubja navadne jelke

50 mg ekstrakta smo raztopili v 6 ml mešanice butanola in HCl v razmerju 95:5. 2 min smo segrevali na vreli vodni kopeli in opazovali obarvanje. Pozitiven rezultat predstavlja rdeče obarvanje raztopine, pozitivna kontrolna raztopina je vzorec Piknogenol.

4.1.2 Vsebnost procianidinov po USP 35 v različnih vzorcih izvlečkov navadne jelke in Piknogenola

Osnovno vzorčno raztopino smo pripravili tako, da smo 250 mg posameznega vzorca raztopili v 100 ml metanola, 5 min mešali v ultrazvočni kadički in centrifugirali (8000 obratov, 21 °C, 5 min). Iz usedline v osnovni raztopini vzorcev 'suhi vodni' in 'Piknogenol' smo pripravili dva nova vzorca z raztopljanjem v acetonu in vodi: 'usedlina suhi vodni' in

'usedlina Piknogenol'. Za pripravo vzorčne raztopine posameznega vzorca smo 1 ml supernatanta redčili do 5 ml z metanolom. 1 ml tako pripravljenega vzorca smo dodali po 6 ml reagenta A (butanol:HCl v razmerju 95:5) in 0,25 ml reagenta B (2 g amonijevega železo (III) sulfata v 100 ml vode in 17,5 ml HCl) ter dobro premešali v ultrazvočni kadički. Vse vzorce smo v vodni kopeli segrevali 40 min pri 95 °C. Po segrevanju smo vzorce hitro ohladili na sobno temperaturo s pomočjo hladne vode. Z reagentom A smo vzorce dopolnili do 10 ml. S pomočjo spektrofotometra smo izmerili absorbanco pri 551 nm. Standardno raztopino smo pripravili iz procianidina B1 (1 mg/ml), ki je ustrezala farmakopejskemu predpisu, ki predpisuje 95 µg/ml procianidinov iz USP Maritime Pine Extract RS v metanolu. Sprejemljiv vzorec vsebuje 65–75 % procianidinov na suho osnovo. Vsebnost procianidinov v % smo izračunali po enačbi:

$$\% \text{ procianidinov} = \frac{A_u}{A_s} \cdot c_s \cdot \frac{V}{W} \cdot D \cdot P$$

A_s – absorbanca standardne raztopine

A_u – absorbanca vzorčne raztopine

C_s – koncentracija antocianidinov v standardni raztopini

D – faktor redčenja za pripravo vzorčne raztopine iz osnovne vzorčne raztopine

P – procent procianidinov v standardni raztopini

V – volumen osnovne vzorčne raztopine

W – natehta vzorca za pripravo osnovne vzorčne raztopine

4.2 Izbira vzorca za uporabo pri metodah separacije in identifikacije

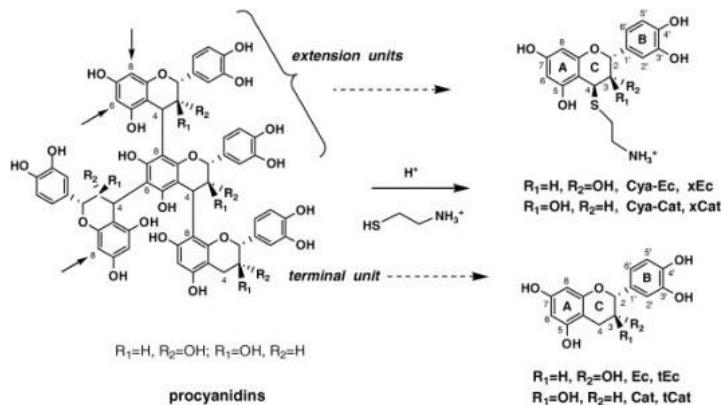
Zanimali sta nas separacija in identifikacija spojin v PEG ABE, zato smo se osredotočili na primerjavo različnih vzorcev, ki smo jih imeli na voljo na FFA, in sicer s pomočjo HPLC analize. Pri določenih metodah pa smo za primerjavo uporabili tudi suhi vodni izvleček. Natehtali smo približno 115,0 g vsakega vzorca iz preglednice II od št. 1 do št. 7 (glej podpoglavlje 3.1 Rastlinski material), kar naj bi približno ustrezalo količini 100 µl. Masa je izračunana glede na gostoto 1,146 kg/dm³ PEG ABE. Vzorce smo raztopili v 1 ml acetonitrila ter dopolnili do 10 ml z vodo. Za primerjavo kromatogramov različnih vzorcev smo uporabili HPLC metodo, ki je opisana v podpoglavlju 4.4 Analizna HPLC.

4.3 Metode separacije

4.3.1 Tiolizna degradacija procianidnih polimerov

Tiolizno reakcijo za PEG ABE smo izvedli po literurnem postopku (2). Gre za neoksidativno depolimerizacijo s cisteaminom v kislem mediju. Proantocianidini razпадajo

na monomerne enote. Učinkovitost reakcije in prisotnost proantocianidinov smo preverili s pomočjo HPLC analize v primerjavi s slepim vzorcem.



Slika 9: Tiolizna degradacija proantocianidinov (33)

Natehtali smo 10 mg vzorca in ga raztopili v 1 ml metanola. Tiolizni reagent smo pripravili s 50 mg cisteaminijevega klorida, ki smo ga raztopili v 20 µl 37 % HCl, ter dodali 930 µl metanola. 200 µl alikvota raztopine vzorca in 200 µl tioliznega reagenta smo zmešali in pustili na vodni kopeli pri 65 °C 15 min. Po ohladitvi smo zmes razredčili z 1,2 ml 0,1 % TFA. Za vsak vzorec smo pripravili tudi slepo zmes. Namesto tioliznega reagenta smo dodali metanol v enaki količini. Z injekcijo smo prenesli vzorce v HPLC viale.

Vzorci:

- (1) PEG izvleček (redčitev 1:10 z metanolom)
- (2) Upraven piknogenol (redčitev 1:5 z metanolom)
- (3) Suhi vodni izvleček (redčitev 1:5 z metanolom in vodo v razmerju 1:1)
- (4) Oborina suhega vodnega izvlečka /Oborino, ki je nastala pri vzorcu (3), smo centrifugirali in raztopili v acettonu in vodi v razmerju 7:3 z enako količino kot pri vzorcu (3)./

Postopek smo ponovili 2x, prvič samo z vzorcem (1), drugič pa z vsemi štirimi vzorci ter s podaljšanim časom segrevanja (30 min) ter 2x višjo koncentracijo reagenta (100 mg reagenta v 20 µl 37 % HCl in 930 µl metanola).

4.3.2 Ekstrakcija

Ekstrakcija je kemijska metoda, ki omogoča prenos molekul želene snovi iz trdne ali tekoče faze v drugo tekočo fazo s pomočjo topila. Ekstrakcija iz trdnih snovi (ekstrakcija trdno-tekoče) temelji na različni topnosti posameznih spojin v ekstrakcijskem topilu, ekstrakcija iz raztopin (ekstrakcija tekoče-tekoče) pa na različni topnosti in

porazdeljevanju spojin iz zmesi v dveh topilih, ki se med seboj ne mešata (običajno voda in organsko topilo) (34).

4.3.2.1 Zaporedna ekstrakcija PEG ABE

Pri zaporedni ekstrakciji smo uporabili topila različnih polarnosti v zaporedju od bolj nepolarnega do bolj polarnega.

Zaporedno ekstrakcijo smo ponovili dvakrat z različnimi topili.

1. Topila so si sledila v zaporedju: petroleter, dietileter, 1-butanol, etilacetat.
2. Topila so si sledila v zaporedju: n-pantan, n-heptan, cikloheksan, toluen, ksilen, diklorometan, kloroform.

Vzorec smo pripravili z mešanjem 5 ml PEG ABE in 45 ml vode. Pri vsaki stopnji ekstrakcije smo vzorcu dodali 50 ml določenega topila. Ekstrakcijo smo izvajali v liju ločniku s pomočjo mešala s 120 obrati/min 15 min. Iz lija ločnika smo uporabili organsko fazo in jo odparili pod znižanim tlakom. Ko odparevanje pod znižanim tlakom ni bilo več učinkovito, smo si pomagali odstraniti topilo s prepihavanjem s helijem in argonom. Dobljenim vzorcem smo dodali 1 ml acetonitrila, v katerem so se ponovno raztopili. Odpipetirali smo 20 µl ekstrakta v acetonitrilu, dodali 1ml acetonitrila ter dopolnili do 10 ml z vodo. Del vsakega vzorca (približno 1,5 ml) smo prek mikrofiltra z injekcijo prenesli v viale za HPLC analizo.

4.3.3 Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE)

Pri SPE tehniki vzorec prehaja skozi trdno fazo, ki zadrži raztopljene snovi z manjšo afiniteto do topila. Eluiramo jih s topilom z večjo elucijsko močjo. SPE tehnika je učinkovitejša in hitrejša od ekstrakcije tekoče-tekoče, ima boljši izkoristek in je lahko avtomatizirana. Zmanjša se tudi poraba topil (35). Retencija lahko vključuje ionske, nepolarne in polarne interakcije. Uporabili smo RP LC-18 sorbent. Učinkovitost SPE smo preverili s HPLC analizo. Izvedli smo SPE dveh vzorcev PEG ABE. Vzorca smo pripravili z redčenjem 1:10. Za redčenje smo uporabili metanol in vodo v razmerju (1:1), ker v sami vodi vzorca nista bila topna.

Mobilne faze:

- (1) 1 ml voda + metanol (1:1) + 2,5 % ocetne kisline
- (2) 1 ml metanol + 2,5 % ocetne kisline
- (3) 1 ml voda + aceton (1:1) + 2,5 % ocetne kisline
- (4) 1 ml aceton + 2,5 % ocetne kisline

Najprej smo kolono sprali z vsemi mobilnimi fazami in jo vsakič osušili. Na koncu smo skozi kolono spirali z začetno mobilno fazo in kolono ponovno osušili. Odpipetirali smo 0,5 ml vzorca v kolono. Z vsako mobilno fazo smo spirali večkrat. Spirali smo dokler v eluatu ni bilo več opaziti obarvanih spojin, ki bi se eluirale z določeno mobilno fazo. Za

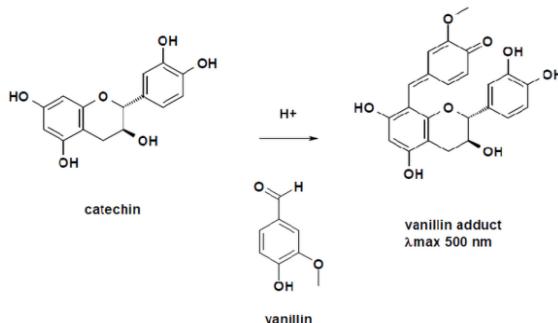


HPLC analize smo vsakič vzeli po prvo frakcijo iz vsakega spiranja z novo sestavo mobilne faze. Kolono smo spirali po 4x, razen pri MF(1), kjer je bilo po četrtem spiranju opaziti še rahlo obarvanje, kar je še kazalo na prisotnost določenih spojin.

Slika 10: Zbrane frakcije PEG izvlečka in suhega vodnega izvlečka

4.3.4 Analizna in preparativna TLC

TLC je adsorpcijska kromatografija (trdno-tekoče). Stacionarna faza je vezana na ploščo. Uporablja se za kvalitativno ločbo (36). TLC smo izvajali na silikagelnih (normalno-fazna) in celuloznih ploščah v nasičenih kadičkah z vertikalnim razvijanjem in različnimi mobilnimi fazami. V kadički je bil vedno prisoten tudi kos filtrirnega papirja, ki zagotavlja konstantne pogoje in nasiti atmosfero v kadički s hlapnimi topili. Za orositveni reagent razvitih plošč smo uporabili vanilin/HCl. Metoda vanilin/HCl je primerna za določanje



proantocianidinov. Vanilin v kislem reagira s prostimi flavan-3-oli in tudi terminalnimi enotami proantocianidinov. Aromatski aldehid (vanilin) reagira z m-substituiranim obročem flavanolov in tvori rdeče obarvan produkt z absorpcijskim maksimumom pri 550 nm. Intenziteta obarvanja je pri reakciji z

monomernimi enotami močnejša, saj pri polimerih reagirajo samo nekatere podenote v primerjavi z monomernimi, kjer reagirajo vse (12, 38, 39, 40). Preparativno TLC smo izvajali na posebnih silikagelnih ploščah z debelejšim nanosom. Po končani separaciji smo ploščo osušili in postrgali ustrezne pasove nosilca, ki so vsebovali posamezne spojine ter iz postrganega silikagela eluirali spojine. Uspešnost separacije preparativne TLC smo preverili s HPLC.

4.3.4.1 Analizna TLC

Z analizno TLC smo ugotavljali ustrezno mobilno fazo za separacijo posameznega vzorca in količino nanesenega vzorca. Razvijali smo v nasičeni kadički s 15 ml mobilne faze. Mobilne faze, ki smo jih uporabili so prikazane v preglednici III.

Preglednica III: Mobilne faze, ki smo jih uporabili pri optimizaciji TLC-ja

	Mobilna faza	Razmerje	Material plošče
1.	toluen:aceton:mrvavljična kislina	3:6:1	silikagel
2.	diklorometan:metanol:ocetna kislina	7:2:1	silikagel
3.	diklorometan:metanol:ocetna kislina	6:2:2	silikagel
4.	diklorometan:metanol	7:3	silikagel
5.	toluen:aceton:ocetna kislina	3:6:1	silikagel
6.	1-propanol:voda:ocetna kislina	4:2:1	celuloza
7.	heksan:aceton:ocetna kislina	6:2:1	silikagel

Mobilna faza 1 je bila naše izhodišče za optimizacijo z različno količino nanosov, nadaljevali smo jo z mobilno fazo 2. Nanesen je bil vzorec PEG ABE. Kot prvo mobilno fazo smo jo izbrali zato, ker je bila uporabljena v literaturi za dokazovanje polifenolov oz. proantocianidinov (2, 12). Z mobilnimi fazami od 3 do 6 smo razvijali TLC plošče, kjer so bili naneseni različni vzorci od leve proti desni v naslednjem zaporedju: PEG ABE, vodna faza druge zaporedne ekstrakcije, suhi vodni izvleček, ekstrakt z etilacetatom in ekstrakt z 1-butanolom. Z mobilno fazo 7 smo razvijali TLC ploščo s sledečim zaporedjem vzorcev od leve proti desni: PEG ABE, suhi vodni izvleček, cikloheksanski ekstrakt (neposredna organska faza ekstrakcije) in ekstrakt z etilacetatom. Redčitev vzorcev je bila 1:10 z metanolom (PEG izvleček, vodna faza ekstrakcije 2) oz. z acetonom in vodo v razmerju 1:1 (suhi vodni izvleček) zaradi boljše topnosti. Ekstrakta z etilacetatom in ekstrakta z 1-butanolom nismo redčili, ker sta bili topili predhodno odstranjeni z odparevanjem pri znižanem tlaku in vzorca nato redčena z acetonitrilom. Ekstraktu z 1-butanolom je bilo potrebno dodati kapljico metanola zaradi visoke viskoznosti. Cikloheksanski vzorec je bil nanesen brez redčenja. Vzorce smo nanašali z 10 µl kapilaro (nanesli smo približno 1/3 tega volumna) na silikagelno oz. celulozno ploščo. Lise so bile široke 1 cm, upoštevali smo razmik med lisami vsaj 0,5 cm. Lise smo nanašali izven 1 cm širokih robov TLC plošče. Za orositveni reagent razvitih plošč smo uporabili vanilin/HCl. Pripravili smo 5 % raztopino vanilina v absolutnem etanolu in 10 % vodno raztopino HCl iz 37 % koncentrirane HCl. Razvito ploščo smo pred orositvijo vedno dobro osušili s sušilnikom na vroč zrak ter pogledali TLC ploščo pod UV lučko pri 254 nm. Vidne lise smo označili s

grafitnim svinčnikom. Po orositvi najprej z vanilinom in takoj za tem s HCl smo ploščo segrevali na 100 °C 1 min.

4.3.4.2 Preparativna TLC

4.3.4.2.1 Optimizacija koncentracije nanosa

Za nanašanje na silikagelno preparativno ploščo smo uporabili Linomat. Nanos je znašal 0,5 mg/1 cm, volumen nanašanja pa 40 µl. Nanosa 1 in 3 sta v razmerju 1:1, nanos 5 pa ima povečan volumen na 80 µl (glej sliko 40 na strani 36). Drugi podatki nanašanja so vidni v preglednici IV. Po preračunanju so koncentracije vzorcev znašale približno 12,5 mg/ml.

($C_{\text{suhi vodni izvleček}} = 12,8 \text{ mg/ml}$, $C_{\text{PEG izvleček}} = 12,7 \text{ mg/ml}$)

Preglednica IV: Podatki nanašanja na preparativno TLC

Širina plošče	20 cm
-Start	3 cm od roba
Širina lise	1,2 cm
Hitrost nanosa	6 s/ µl
Volumen nanosa	40 µl

Razvijali smo v nasičeni kadički s pomočjo filtrirnega papirja. Uporabili smo 60 ml mobilne faze toluen:aceton:ocetna kislina (3:6:1). Za orositveni reagent razvitih plošč smo uporabili vanilin/HCl. Pripravili smo 5 % raztopino vanilina v absolutnem etanolu in 10 % vodno raztopino HCl iz 37 % koncentrirane HCl. Razvito ploščo smo pred orositvijo vedno dobro osušili s sušilnikom na vroč zrak ter pogledali TLC ploščo po UV lučko pri 254 nm, če so vidne kakšne lise in jih označili s grafitnim svinčnikom. Po orositvi najprej z vanilinom in takoj za tem s HCl smo ploščo segrevali na 100 °C 1 min.

4.3.4.2.2 Priprava preparativne TLC

Razvijali smo v nasičeni kadički s pomočjo filtrirnega papirja. Uporabili smo 60 ml mobilne faze toluen:aceton:ocetna kislina (3:6:1). Vzorec smo nanašali ročno. Povečali smo širino lise na 7 cm, zato se je povečal tudi volumen nanosa na približno 950 µl. Razvito ploščo smo osušili s sušilnikom na vroč zrak in na njej označili vidne lise pod UV lučko pri 254 nm. Silikagel smo na področjih, kjer so nastale lise, odstranili s pomočjo skalpela in ga suspendirali v 2 ml acetona in vode v razmerju 7:3. Vzorec smo raztapliali s

pomočjo ultrazvočne kadičke in nato centrifugirali 5 min pri 3000 obratih in 25 °C. Po centrifugiranju smo supernatant s pomočjo injekcije prenesli v viale za HPLC analizo.

4.3.5 'Flash' kolonska kromatografija

'Flash' kolonska kromatografija je adsorpcijska kromatografija (trdno-tekoče). Od običajne kolonske kromatografije se razlikuje v tem, da mobilna faza prehaja kolono pod pritiskom s pomočjo črpalke. Uporabili smo jo za ločevanje spojin z različnimi mobilnimi fazami. Metoda omogoča ločevanje večje količine vzorcev, zato je v primerjavi s preparativno TLC manj zamudna. Sestavljata jo normalnofazna kolona in aparatura za zbiranje frakcij (34). Uporabili smo kolono velikosti 40 x 150 mm, ki smo jo predhodno napolnili s silikagelom 60 s pomočjo vakuma. Za določitev mobilne faze smo se odločili glede na predhodno TLC. Dobljene frakcije smo nato analizirali s HPLC. Pred nanosom vzorca smo kolono spirali s toluenom. Nato smo spirali z mobilnimi fazami, ki so opisane po vrstnem redu uporabe v preglednici V.

Preglednica V: Vrstni red uporabljenih mobilnih faz

Št. frakcij	Volumen frakcij [ml]	Mobilna faza	Razmerje
1 – 60	1	toluen:aceton:ocetna kislina	3:6:1
61 – 120	1	toluen:aceton:ocetna kislina	1:8:1
121 – 180	1	aceton:ocetna kislina	9:1
181 – 185	100	aceton:metanol:ocetna kislina	6:3:1

Opomba: V začetnih zbranih frakcijah novo začetih MF se pojavlja še predhodna MF zaradi mrtvega volumna, ki ga nismo spuščali mimo zbiralca v odpad.

Za pripravo vzorca smo uporabili 0,498 g PEG ABE in ga raztopili v 0,2 ml začetne MF (toluen:aceton:ocetna kislina – 3:6:1). Zadnja MF je bila pripravljena z namenom, da se sperejo vse spojine iz kolone, ker je bila po frakciji 180 kolona še vedno rahlo obarvana. Pretok skozi aparaturo je bil 10 ml/min. Dobljene frakcije smo testirali s HPLC analizo. Za nadaljnjo separacijo smo izbrali najbolj koncentrirane in po vsebnosti spojin najbolj raznolike frakcije. Vzorce, ki so bili izbrani smo koncentrirali z odparevanjem pod znižanim tlakom oz. smo jih pustili v digestoriju, da je mobilna faza izhlapela. Frakcije smo nato raztopili v čim manjši količini acetonitrila in vode (2:3).

4.4 Analizna HPLC

Uporabili smo RP18 kolono v kombinaciji z UV-VIS detektorjem z devterijsko in volframovo žarnico (190–800 nm) ter gradientno elucijo. Detektirali smo pri valovni dolžini 280 nm 15 min.

Gradientna mobilna faza je bila sestavljena iz:

- A) vode + 2 % acetonitrila + 0,1 % TFA
- B) acetonitrila + 2 % vode + 0,1 % TFA

Gradientna analiza se je začela z začetno mobilno fazo A in nadaljevala s postopnim povečevanjem mobilne faze B (0–1 min 5 % B, 1–10 min 5–30 % B, 10–15 min 100 % B). Pretok mobilne faze je bil 2 ml/min. Injicirali smo 10 µl vzorca. Pri optimizaciji analizne metode HPLC smo spremajali čas analize, pretok mobilnih faz in gradient mobilnih faz. Pri dodatku standardov smo spremajali tudi količino injiciranega vzorca. Vse vzorce smo pripravili z acetonitrilom in vodo (večinoma v razmerju 2:3), ker je bila takšna sestava mobilne faze pri HPLC analizi. Na kromatogramih vzorcev so bili ob dodatku vode vrhovi simetrični, medtem ko smo pri samem acetonitrilu, v katerem smo raztapljali na začetku, opazili pojav ram in nesimetričnosti. Za vse tehnike separacije smo uporabili metodo HPLC. Ker smo s 'flash' kolonsko kromatografijo dobili najoptimalnejše rezultate v primerjavi z drugimi tehnikami, smo z dobljenimi frakcijami nadaljevali z optimizacijo metod na HPLC. Optimizirane metode so podane v preglednici VI. Spreminjali smo gradientno elucijo, torej sestavo mobilne faze in čas analize. Pri tem pa nismo spremajali pretoka ter volumna injiciranega vzorca. Ko smo dobili optimalne kromatograme z ustreznim časom analize, smo prilagodili metode za nadaljnjo uporabo na MS. Spremenili smo pretok mobilne faze iz 2 ml/min na 0,5 ml/min. Sorazmerno smo podaljšali tudi čas analize. Drugih parametrov nismo spremajali.

Preglednica VI: Pregled optimiziranih metod na HPLC in za nadaljnjo uporabo na MS

Št. zaporedne frakcije	Optimizirana metoda	Uporabljene metode na MS
FR 21	0–1 min = 5 % B	0–4 min = 5 % B
	1–2,5 min = 5–10 % B	4–10 min = 5–10 % B
	2,5–10 min = 10 % B	10–40 min = 10 % B
	10–12 min = 10–12 % B	40–48 min = 10–12 % B
	12–17 min = 100 % B	48–60 min = 100 % B
FR 8	0–1 min = 5 % B	0–4 min = 5 % B
	1–10 min = 5–30 % B	4–40 min = 5–30 % B
	10–12 min = 100 % B	40–48 min = 100 % B
FR 43	0–1 min = 5 % B	0–4 min = 5 % B
	1–2,5 min = 5–10 % B	4–10 min = 5–10 % B
	2,5–8 min = 10–12 % B	10–32 min = 10–12 % B
	8–12 min = 100 % B	32–48 min = 100 % B
FR 17	0–20 min = 15 % B	0–40 min = 15 % B
	20–25 min = 100 % B	40–50 min = 100 % B
FR 37 = FR 8	0–1 min = 5 % B	0–4 min = 5 % B
	1–10 min = 5–30 % B	4–40 min = 5–30 % B
	10–12 min = 100 % B	40–48 min = 100 % B
FR 133	0–1 min = 10 % B	0–4 min = 10 % B
	1–4 min = 10–50 % B	4–16 min = 10–50 % B
	4–13 min = 50 % B	16–52 min = 50 % B
	13–15 min = 100 % B	52–60 min = 100 % B

4.5 Metode identifikacije

4.5.1 LC/MS

Za identifikacijo spojin v PEG ABE smo uporabili kombinacijo kromatografije in spektrometrije. Uporabili smo ultra zmogljivo tekočinsko kromatografijo (UPLC) sklopljeno z masnim spektrometrom. Masni spektrometer nam je omogočal uporabo vira ionizacije z razprševanjem raztopin v električnem polju ESI in analizatorja na osnovi časa preleta ionov Tof, s katerim smo izmerili mase ionov na štiri decimalke natančno v masnem spektru, natančne masse produktnih ionov (MS/MS), reaktantnih ionov in nevtralnih molekul, ki se odcepijo od določenega iona. Vzorec je po injiciranju potoval čez kolono v komoro masnega spektrometra, kjer se je uparil in ioniziral z uporabo vira ionizacije ESI. Uporabili smo negativni ESI– (nastanek anionov) in pozitivni ESI+ (nastanek kationov). Nastale ione smo nato detektirali glede na čas potovanja do detektorja Tof. Kot rezultat analize smo dobili masne spektre spojin, ki so nas zanimale. Programska oprema masnega spektrometra nam je omogočala tudi izračun najverjetnejše molekulske

formule izbranega masnega vrha. Za molekulske vrhove smo izmerili natančne mase produktnih ionov (MS/MS), za njihov nastanek smo poskusili uporabo različnih napetosti.

4.5.1.1 UPLC

UPLC smo uporabili, ker je bil povezan z našim masnim spektrometrom. Pri UPLC-ju so dovoljeni višji tlaki analiz. Uporabimo lahko kolone, ki imajo manjše delce kot običajne in tako dosežemo boljšo separacijo. Za izvedbo optimiziranih metod z UPLC-jem smo uporabili isto kolono kot v podpoglavlju 4.4 Analizna HPLC.

Gradientna mobilna faza je bila sestavljena iz:

- A) vode + 0,1 % mravljične kisline
- B) acetonitrila

Uporabili smo optimizirane metode za analize z UPLC, ki so bile prilagojene različnim vzorcem (glej podpoglavlje 4.4 Analizna HPLC, preglednica VI). Pretok mobilne faze je bil 0,5 ml/min. Injicirali smo 5 µl vzorca. Pri gradientni mobilni fazi UPLC-ja smo uporabili mravljično kislino kot sestavni del mobilne faze A namesto TFA. Pri HPLC-ju s TFA dosežemo boljšo ločljivost in retencijo spojin, pri masni spektrometriji pa zmanjša MS signal, ker tvori adukte z analitom. Posledično so ioni nastali z razprševanjem prikriti.

4.5.1.2 MS

Pogoji ionizacije so opisani v preglednici VII in so enaki za vse metode.

Preglednica VII: Preglednica pogojev, ki smo jih uporabili pri analizi LC/MS

Pogoji ionizacije	ESI+	ESI-
Napetost na kapilari (kV)	3	3
Napetost vhodne leče (V)	20	20
Temperatura izvora (°C)	100	100
Temperatura razpršilnega plina dušika (°C)	200	200
Pretok razpršilnega plina dušika (L/h)	600	600
Pretok plina dušika vhodne leče (L/h)	20	10
Trkovna energija (kV)	10	5

Pri ugotavljanju, kateri fragmenti spadajo k določeni spojnini, če le-ta ni bila zadovoljivo separirana, smo si pomagali s funkcijami programa masnega spektrometra.

4.5.2 Določanje spojin s pomočjo standardov

Določene spojine smo potrdili tudi s standardi, ki so nam bili na voljo. Najprej smo injicirali v sistem HPLC standard določene koncentracije, nato pa smo izračunali koncentracijo spojine v vzorcu PEG ABE s pomočjo primerjave površin vrhov in koncentracije standarda. Kvantitativno smo določili koncentracijo spojine v vzorcu. Preračunano koncentracijo standarda smo dodali vzorcu PEG ABE. Pri identifikaciji smo si pomagali tudi s primerjavo UV-VIS spektrov standarda in spojine v vzorcu.

4.5.3 Plinska kromatografija (GC)

Sestavo vzorca PEG ABE smo preverili tudi z GC, ki nam je potrdila prisotnost določenih bolj hlapnih spojin. GC nismo izvajali v okviru našega diplomskega dela.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Analiza vzorcev izvlečkov lubja navadne jelke na prisotnost in vsebnost procianidinov po USP 35

Rezultati obeh testov so lahko pri nekaterih vzorcih podcenjeni, saj se vsi niso popolnoma raztopili v metanolu oz. butanolu:HCl, zato smo testirali tudi usedlini Pknogenola in vodnega suhega ABE, ki pa smo ju raztopili v topilu aceton:voda (7:3). Pri večini izvlečkov v PEG 400 je bila gosta usedlina prisotna že v vsebniku in se kljub mešanju ni raztapljala v supernatantu.

Preglednica VIII: Rezultati identifikacijskega testa in testa vsebnosti vseh vzorcev

Št. vzorca		Usedlina v metanolu	Vsebnost procianidinov (%)	Prisotnost procianidinov	
					Barva
1	Izvlečki v PEG 400	–	0	–	rahlo oranžno roza
2		–	3,21	–	rdeče roza
3		–	5,77	–	oranžna
4		–	1,79	–	rdeče roza
5		–	1,43	–	oranžna
6		–	6,39	–	oranžno rdeča
7		–	3,93	–	oranžna
8	Suh uprašeni izvleček	–	131,43	–	ciklamno roza
9		+	25,99	–	svetlo ciklamno roza
10		+	9,66	+	rdeča
11		aceton:voda	61,36	–	rumena oborina
12		aceton:voda	3,57	–	rjava oborina
13		+	22,78	/	/
14		+	6,07	/	/

V času, ko smo izvajali teste, smo pričakovali, da je v vzorcih veliko procianidinov. Ker prvi testi niso dali pričakovanih rezultatov, smo postopek identifikacije ponovili 1x za dokaz in 4x za postopek analize vsebnosti procianidinov. Ponovili smo jih tudi zaradi sprememb in izboljšav pri prilagajanju naši opremi in pogojem za delo. Redčitev pri prvi ponovitvi testa vsebnosti smo zmanjšali iz 1:20 na 1:5, ker bi lahko šlo za preredke vzorce, saj je PEG v vzorcih predstavljal določen del celotne mase, vendar smo ugotovili, da to ni vplivalo rezultate. Pri ponavljanju postopka smo povečali čas in intenziteto mešanja vzorcev. Po farmakopejskih navodilih naj bi pri dodatku reagentov in med segrevanjem uporabljali 10 ml viale s posebno zatesnitvijo, nato pa bi bil potreben kvantitativen prenos z reagentom A v 10 ml bučke. Namesto tega smo uporabili neposredno 10 ml bučke, jih

med segrevanjem pokrili z aluminijasto folijo in po segrevanju dopolnili do oznake z reagentom A. Rezultati testa prisotnosti in vsebnosti procianidinov se niso ujemali. Pri testu prisotnosti se je izkazalo, da se je rdeče obarval le vzorec s Pikkogenolom. Drugi vzorci so bili vrednoteni negativno zaradi drugih odtenkov barv, ki so bili verjetno posledica stranskih kemijskih reakcij. Sklepali smo, da je vzrok za nizke rezultate lahko dodan PEG, ki bi motil analizo. Zato smo preverili vsebnost še z vzorcema 13 in 14 z dodatkom 100 mg PEG-a s 7,5 % vodo. Po izračunu ni bilo opaznih večjih razlik oz. bistvenih sprememb, zato smo ovrgli hipotezo, kar se je kasneje izkazalo kot pravilno sklepanje, saj so vzorci dejansko vsebovali zelo malo procianidinov, kar smo ugotovili pri identifikaciji. Večje količine procianidinov sta vsebovala le suhi patentni in suhi vodni vzorec, vendar ni bilo značilnega rdečega obarvanja. Presenetljivo pa jih glede na test vsebnosti kljub rdečemu obarvanju pri testu prisotnosti ni vseboval Pikkogenol. Omeniti velja, da je bil rok uporabe Pikkogenola že tri leta pretečen. Pri zadnji ponovitvi preverjanja vsebnosti procianidinov smo izmerili absorbanco vzorcev tudi pred segrevanjem na vodni kopeli. Če bi vzorci absorbirali svetlobo že pred segrevanjem, naj bi namreč vsebovali flavan-3,4-diole in flavan-4-ole (31).

Preglednica IX: Izmerjene absorbance pred in po segrevanju

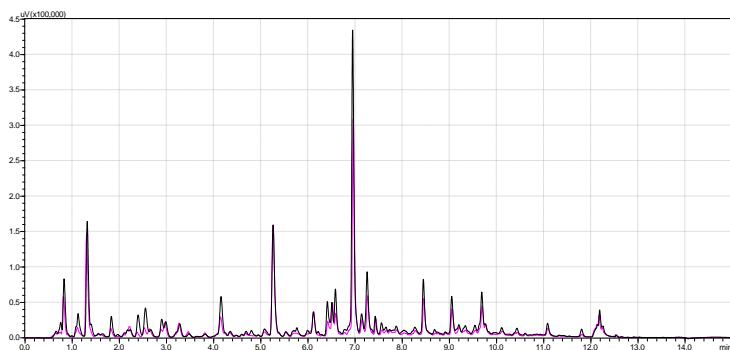
Št. vzorca	Pred segrevanjem (A)	Po segrevanju (A)
1	0,002	0
2	0,003	0,009
3	0,008	0,016
4	0,006	0,005
5	0,002	0,004
6	0,034	0,018
7	0,001	0,011
8	0,001	0,368
9	0,003	0,073
10	0,020	0,028
11	0,039	0,268
12	0,009	0,010
13	0,001	0,064
14	0,020	0,017

Meritev absorbanc pred segrevanjem nam je pokazala, da so vzorci vsebovali tudi monomerne enote procianidinov, vendar se je pri vzorcu 7 absorbanca po segrevanju celo znižala, zato smo lahko sklepali tudi na napake pri meritvah oz. da je sprememba barve nastopila zaradi antocianidinom podobnih snovi. S testi smo dokazali, da so procianidini in njihovi monomeri prisotni v vzorcih ABE v majhnih količinah in ne v količinah, ki so predpisane po USP 35 (preglednica VIII). Po drugi strani je možno, da uporabljena metoda

ni ustrezna in rezultati niso pravilni. Farmakopeja metodo namreč predpisuje le za Piknogenol, mi pa smo jo uporabili za drugačne vzorce. Kasneje se je izkazalo, da so ti vzorci Piknogenolu podobni manj, kot smo pričakovali.

5.2 Izbira vzorca za uporabo pri metodah separacije in identifikacije

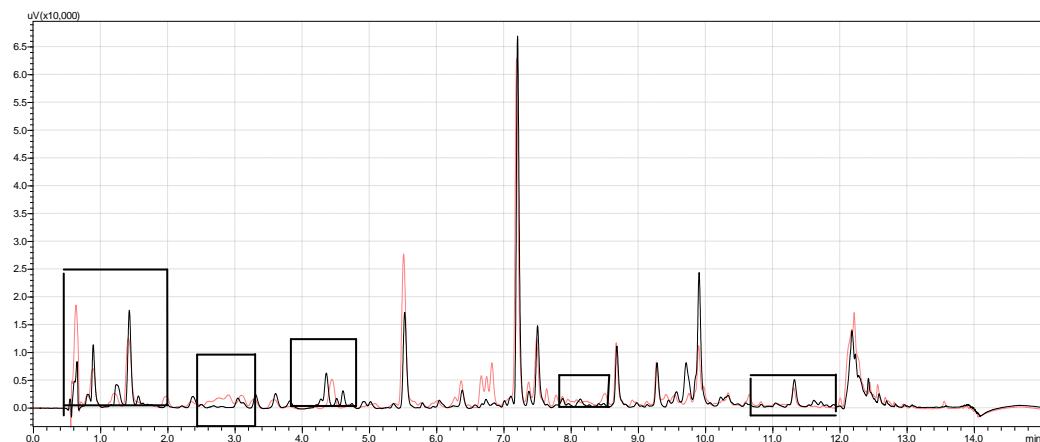
Vzorce PEG ABE enake koncentraciji smo primerjali s pomočjo HPLC kromatogramov. Vzorci so bili primerljivi. Odločili smo se, da v nadaljnjih analizah uporabljam vzorec št. 4, ker smo dobili najbolj ozke vrhove in smo ga imeli največ v zalogi.



Slika 12: Primer primerjave vzorcev št. 3 in št. 4

5.3 Metode separacije

5.3.1 Tiolizna degradacija procianidnih polimerov



Slika 13: Kromatogram PEG ABE pred tiolizo in po njej

V obravnavo smo vzeli samo vrhove, ki so izstopali oz. spojine, ki so dobro absorbirale in se je višina vrha po tiolizi očitno spremenila oz. kjer je nastal nov vrh ali je vrh izginil (preglednica X). Za spojine, ki imajo nizke vrhove je namreč težko določiti ali se je površina pod krivuljo dejansko spremenila ali pa gre za analitsko napako. Te spremembe so na sliki 13 označene s kvadrati.

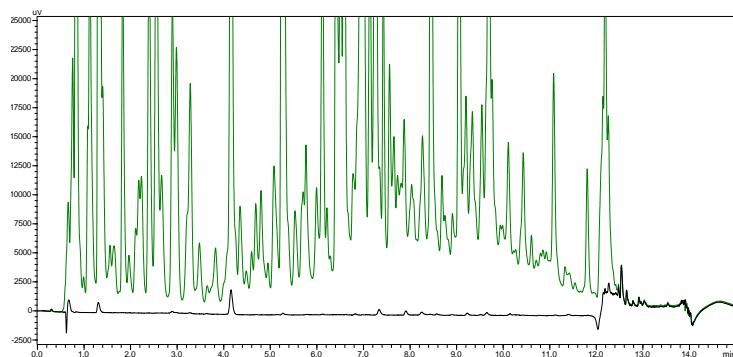
Preglednica X: Rezultati tiolizne degradacije procianidnih polimerov

Slep vzorec		Tiolizni vzorec		Δ AUC	%	Razlaga po teoriji tiolizne degradacije
Rt	AUC	Rt	AUC			
1,974	13243	1,984	3489	9754	↓ 73,6	polimer
2,899	14952	/	/	14952	↓ 100,0	polimer
3,816	4336	3,815	8937	4601	↑ 51,5	monomer
5,509	113621	5,523	62053	51568	↓ 45,4	polimer
6,273	8902	6,245	597	8305	↓ 93,3	polimer
6,661	19990	6,672	2319	17671	↓ 88,4	polimer
6,742	17946	6,732	6154	11792	↓ 65,7	polimer
6,820	30208	6,852	4116	26092	↓ 86,4	polimer
7,635	10204	7,643	2150	8054	↓ 78,9	polimer
7,775	8247	7,778	1513	6734	↓ 81,7	polimer
8,502	15949	8,484	3364	12585	↓ 78,9	polimer
9,751	8529	9,710	41473	32944	↑ 79,4	monomer
9,897	38253	9,903	80533	42280	↑ 52,5	monomer
10,649	7320	10,644	1337	5983	↓ 81,7	polimer

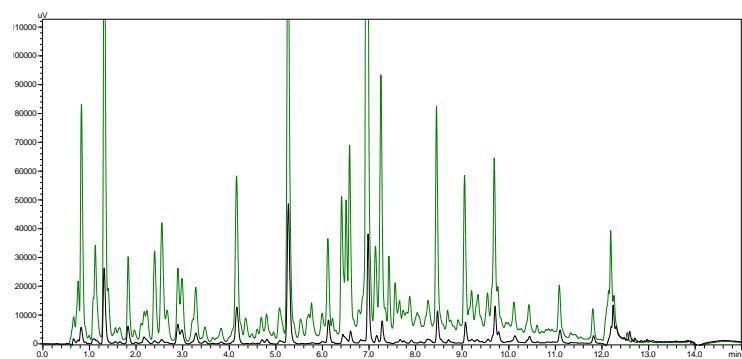
S tiolizno degradacijo smo dokazali, da so v PEG ABE prisotne polimerne spojine, ki s tiolizo razpadajo na monomerne enote.

5.3.2 Zaporedna ekstrakcija PEG ABE

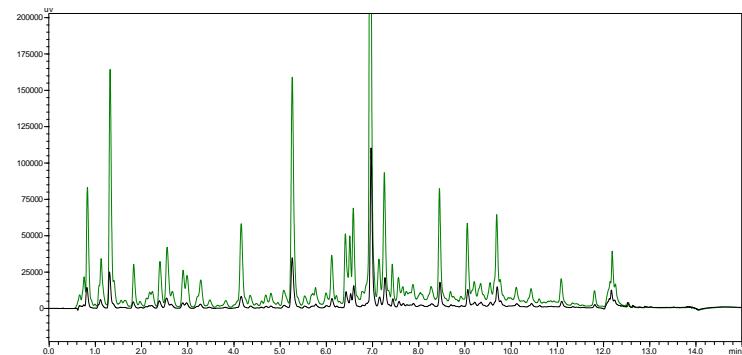
Pri vseh primerih je bila organska faza zgornja plast. Vodno fazo oz. vodni ostanek od zaporedne ekstrakcije smo shranili. Naš cilj je bil, da bi ločili določene spojine po polarnosti, in sicer da bi se v bolj nepolarna topila ekstrahirale samo določene spojine, ki so bolj nepolarne. Redčitve vzorcev so bile narejene po enakem postopku za vsako HPLC analizo, zato so rezultati vzorca PEG ABE in vzorci zaporedne ekstrakcije z različnimi topili med sabo primerljivi.



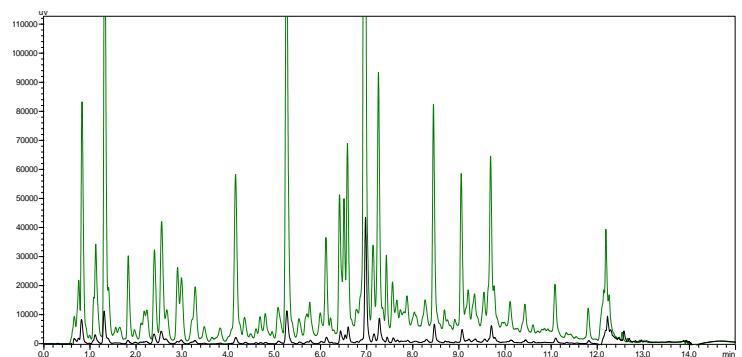
Slika 14: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta s petroletrom



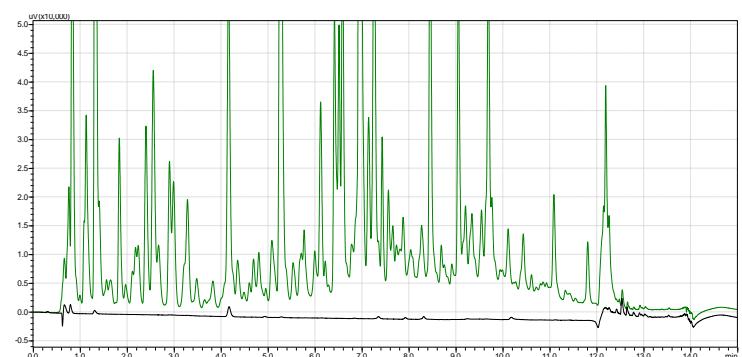
Slika 15: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta z dietiletrom



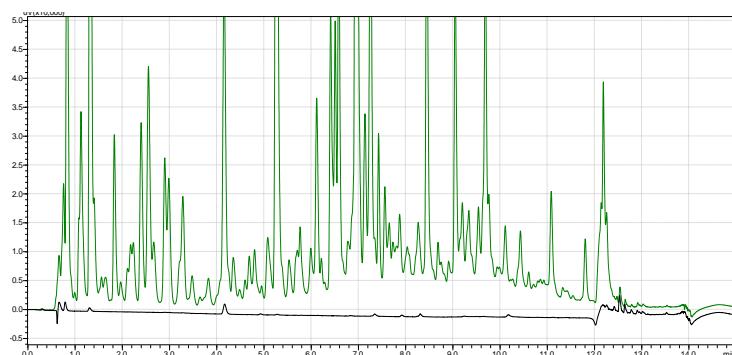
Slika 16: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta z 1-butanolom



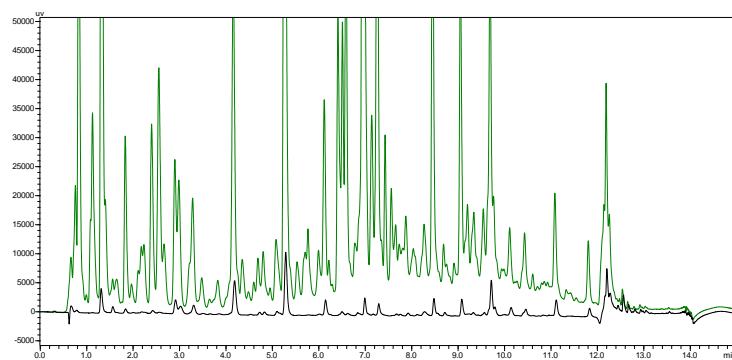
Slika 17: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta z etilacetatom



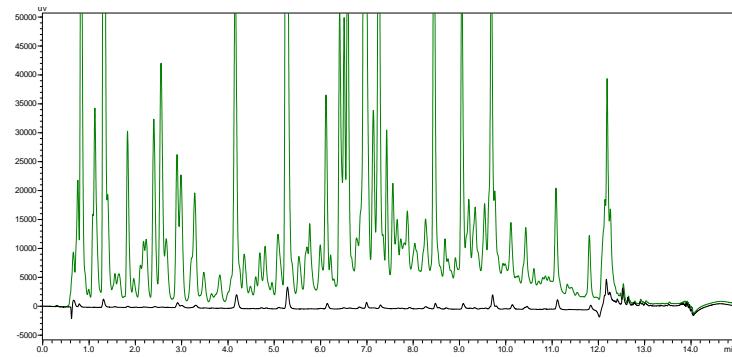
Slika 18: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta z n-pentanom



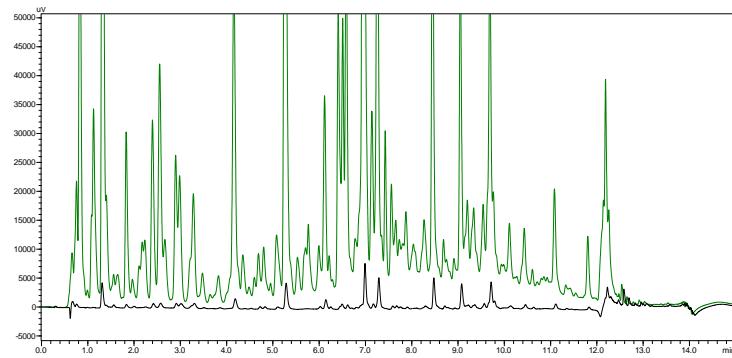
Slika 19: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta z n-heptanom



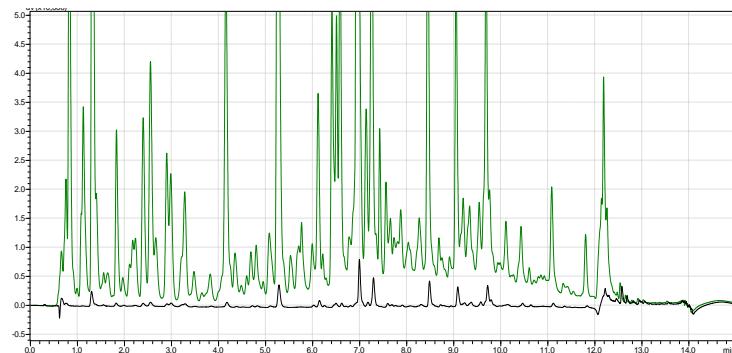
Slika 20: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta s toluenom



Slika 21: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta s ksilenom

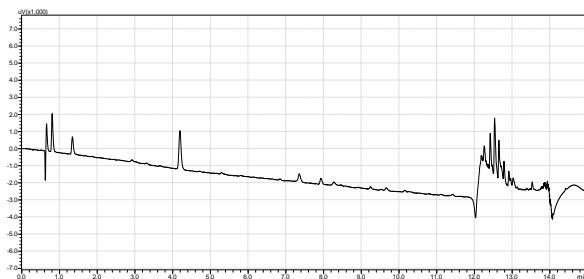


Slika 22: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta z diklorometanom



Slika 23: Primer primerjave kromatograma PEG ABE in ekstrakta s kloroformom

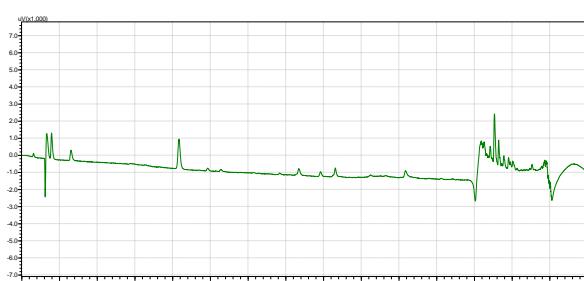
Zaporedna ekstrakcija glede separacije spojin ni bila uspešna, saj je bil izkoristek ekstrakcije zelo slab. Zato z vzorci ekstrakcije nismo nadaljevali z identifikacijo. Opazili pa smo, da se z bolj nepolarnimi topili, kot so n-pentan, n-heptan in petroleter izločita spojini z vrhom pri Rt okoli 1,25 min in 4,00 min bolj izrazito od ostalih. To kaže na večjo lipofilnost teh dveh spojin.



Slika 24: Kromatogram ekstrakta z n-pentanom

Preglednica XI: Pregled izkoristka ekstrakta z n-pentanom v primerjavi s PEG ABE

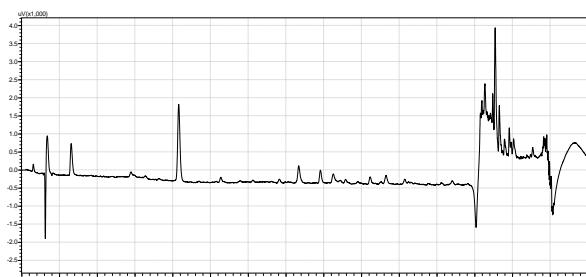
PEG ABE		Ekstrakt z n-pentanom		Izkoristek (%)
Rt	AUC	Rt	AUC	
1,32	542892	1,34	3543	0,65
4,16	261363	4,19	9589	3,67



Slika 25: Kromatogram ekstrakta z n-heptanom

Preglednica XII: Pregled izkoristka ekstrakta n-heptana v primerjavi s PEG ABE

PEG ABE		Ekstrakt z n-heptanom		Izkoristek (%)
Rt	AUC	Rt	AUC	
1,32	542892	1,30	2080	0,38
4,16	261363	4,17	7748	2,96



Slika 26: Kromatogram ekstrakta s petroletrom

Preglednica XIII: Pregled izkoristka ekstrakta s petroletrom v primerjavi s PEG ABE

PEG ABE		Ekstrakt s petroletrom		Izkoristek (%)
Rt	AUC	Rt	AUC	
1,32	542892	1,31	3275	0,60
4,16	261363	4,16	9196	3,52

Izkoristek ekstrakcije snovi z Rt 1,32 min in Rt 4,16 min je nizek, kljub temu pa z ekstrakcijo močno povečamo razmerje te snovi proti ostalim snovem iz lubja navadne jelke (nečistote). Metoda bi lahko bila uporabna za ekstrakcijo teh dveh snovi, vendar bi morali ekstrakcijo ponavljati vsaj 25x, saj bi s tem povečali koncentracijo ciljne spojine. 25x bi se povečala tudi količina nečistot, vendar bi verjetno razmerje med želenimi snovmi in nečistotami ostalo ugodno. S topili toluenom, ksilenom in diklorometanom smo dobili enako slabe izkoristke kot pri n-pentanu, n-heptanu in petroletru, le da je pri toluenu, ksilenu in diklorometanu izstopalo več posameznih vrhov (glej preglednice XIV, XV in XVI).

Preglednica XIV: Pregled izkoristka ekstrakta s toluenom v primerjavi s PEG ABE

PEG ABE		Ekstrakt s toluenom		Izkoristek (%)
Rt	AUC	Rt	AUC	
1,35	532187	1,32	15528	2,92
4,19	244929	4,20	25285	10,32
5,31	623538	5,30	43169	6,92
6,11	143581	6,13	9694	6,75
7,00	1446272	7,00	9759	0,67
7,28	319576	7,30	6596	2,06
8,45	257867	8,45	9996	3,88
9,05	184047	9,10	10424	5,66

Izstopa izkoristek kromatografskega vrha pri Rt 4,19 min. Če bi ekstrakcijo ponovili 10x, bi spojino lahko izolirali, vendar smo kasneje razvili optimalnejšo metodo.

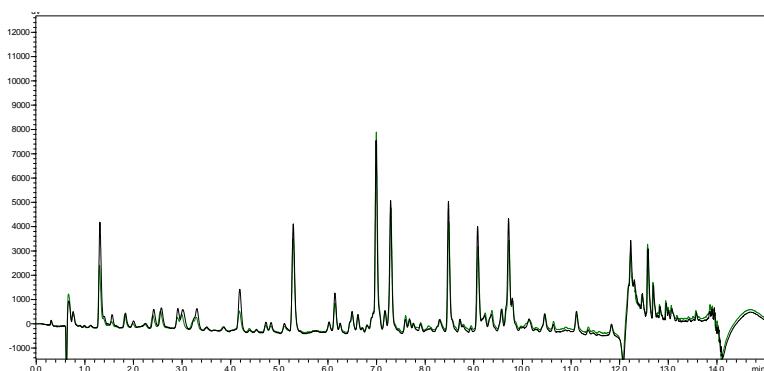
Preglednica XV: Pregled izkoristka ekstrakta s ksilenom v primerjavi s PEG ABE

PEG ABE		Ekstrakt s ksilenom		Izkoristek (%)
Rt	AUC	Rt	AUC	
1,35	532187	1,30	4912	0,92
4,19	244929	4,20	11232	4,59
5,31	623538	5,30	15301	2,45

Preglednica XVI: Pregled izkoristka ekstrakta z diklorometanom v primerjavi s PEG ABE

PEG ABE		Ekstrakt z diklorometanom		Izkoristek (%)
Rt	AUC	Rt	AUC	
1,35	532187	1,31	14265	2,68
4,19	244929	4,20	6935	2,83
5,31	623538	5,30	18765	3,01
7,00	1446272	7,00	27514	1,90
7,28	319576	7,30	19254	6,02
8,45	257867	8,49	17784	6,90
9,05	184047	9,10	15311	8,32

Z diklorometanom in kloroformom, ki je sledil diklorometanu in sta podobne polarnosti, so se pri zaporedni ekstrakciji ekstrahirale iste spojine kot je razvidno s slike 27. Pri obeh topilih se je ekstrahiral večji delež tako naših ciljnih spojin kot spojin, ki so za nas nečistote. Zato metoda tudi v tem pogledu ni bila uspešna.



Slika 27: Prekrivanje kromatogramov ekstrakta z diklorometanom in ekstrakta s kloroformom

Z zaporedno ekstrakcijo izvlečka PEG ABE z dietiletrom nismo dobili nobene spojine, ki bi v kromatogramu izstopala, kar je razvidno tudi iz preglednice XVII. Opazili pa smo, da so se najmanj ekstrahirale spojine na sredini kromatograma (med Rt 6 min in Rt 8 min).

Preglednica XVII: Pregled izkoristka ekstrakta z dietiletrom v primerjavi s PEG ABE

PEG ABE		Ekstrakt z dietiletrom		Izkoristek (%)
Rt	AUC	Rt	AUC	
1,35	532187	1,32	93006	17,48
1,82	96056	1,81	23060	24,01
5,31	623538	5,30	184687	29,62
6,60	219020	6,60	184687	8,05
7,00	1446272	6,98	119552	8,26
7,28	319576	7,25	30109	9,42
8,45	257867	8,45	38906	15,09
9,05	184047	9,05	25617	13,92

S topiloma 1-butanol in etilacetat, ki sta sledili v zaporedni ekstrakciji za petroletrom in dietiletrom, so se ekstrahirale vse spojine v enakem razmerju. To smo dokazali tudi z izračunom izkoristkov. Za tri najvišje vrhove so izračuni izkoristkov prikazani v preglednicah XVIII in XIX.

Preglednica XVIII: Pregled izkoristka ekstrakta z 1-butanolom v primerjavi s PEG ABE

PEG ABE		Ekstrakt z 1-butanol		Izkoristek (%)
Rt	AUC	Rt	AUC	
5,31	623538	5,31	142741	22,89
7,00	1446272	6,99	355515	24,58
8,45	257867	8,45	55682	21,59

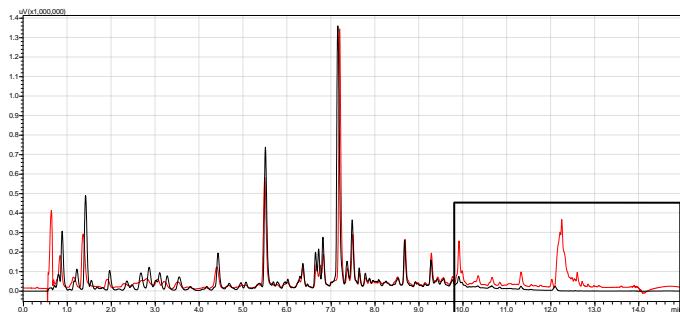
Preglednica XIX: Pregled izkoristka ekstrakta z etilacetatom v primerjavi s PEG ABE

PEG ABE		Ekstrakt z etilacetatom		Izkoristek (%)
Rt	AUC	Rt	AUC	
5,31	623538	5,28	46162	7,40
7,00	1446272	7,00	139903	9,67
8,45	257867	8,47	21737	8,43

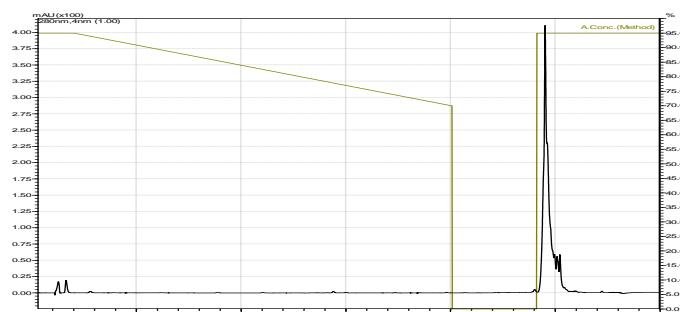
5.3.3 Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE)

S SPE nismo dobili želenih rezultatov, saj so se z mobilno fazo metanol:voda izločile vse polarnejše spojine hkrati. To je bilo razvidno v primerjavi z referenčnim vzorcem (slika 28). Razlika je označena s kvadratom. Z naslednjo mobilno fazo metanolom pa so se eluirale vse spojine, ki so še ostale na koloni oz. lipofilnejše spojine (slika 29). Z mobilno fazo aceton:voda se ni eluiralo nič (slika 30). Na kromatogramu je viden samo vrh acetona, ki se eluira iz kolone na začetku s fronto. S tem nismo dosegli našega cilja, namreč ločiti spojine na začetku in na sredini kromatograma vzorca PEG ABE. Zato ta separacijska metoda za nadaljevanje ni bila ustrezna. Metoda bi lahko bila zanimiva za identifikacijo

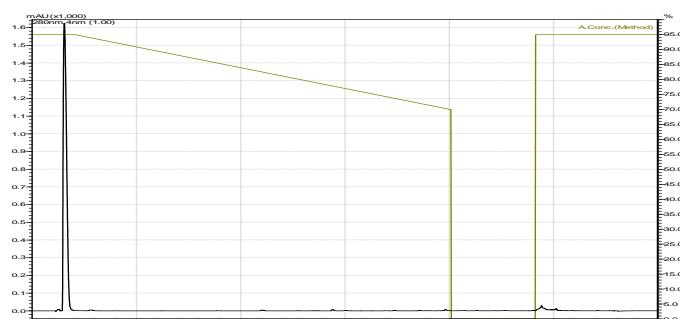
lipofilnih spojin ali njihovo odstranitev (po masi so lahko pomembnejše kot je videti na HPLC kromatogramu).



Slika 28: Primerjava SPE metanol:voda (1:1) + 2,5 % ocetne kisline in PEG ABE



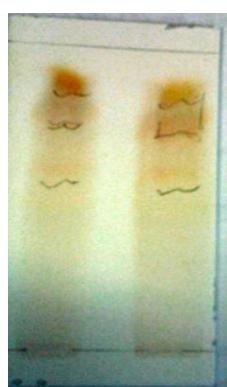
Slika 29: Rezultat SPE metanol + 2,5% ocetne kisline



Slika 30: Rezultat SPE aceton:voda (1:1) + 2,5% ocetne kisline

5.3.4 Analizna in preparativna TLC

5.3.4.1 Analizna TLC



Slika 31: MF(1)

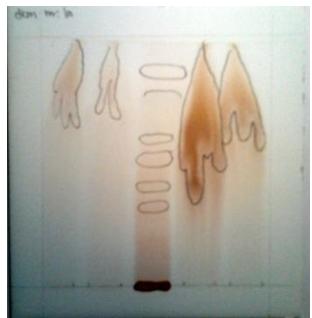


Slika 32: MF(2)

Z analizno TLC smo določali optimalne razmere, ki smo jih potem uporabili pri pripravi preparativne TLC.

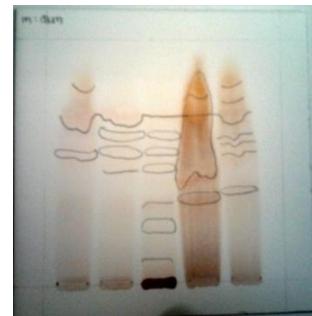
Pri prvem poskusu izvedbe analizne TLC z vzorcem PEG ABE (slika 31) je opazno, da so se spojine skoncentrirale na vrhu TLC-ja. Spojine imajo visoko

retenco zaradi večje afinitete do mobilne faze. Nastale lise so slabo vidne in razvlečene. Z mobilno fazo 2 lise niso nastale (slika 32). Nanesen vzorec se je ločil po dveh barvah. Možna bi bila prenizka količina kisline, vendar smo po zvečanju kisline v mobilni fazi dobili enak rezultat. Podoben rezultat smo dobili tudi pri enaki sestavi mobilne faze brez kisline. Zato smo sklepali, da je za to kriv PEG v vzorcih, kar dokazuje slika 33, na kateri je vidno, da se je suhi vodni izvleček lepše ločil od ostalih in da so nastale določene lise, niso pa nastali dolgi repi kot pri drugih. PEG je verjetno upočasnil kapilarni vlek, kar je povzročilo neenakomerno potovanje po stacionarni fazi. Repi lahko nastanejo tudi zaradi močne vezave vzorca na stacionarno fazo. Zato bi bila možna rešitev izvedba deaktivacije silikagela na način, da se zasede močna vezavna mesta in se tako zmanjša retanca spojin vzorca. S TLC-ji na sliki od 33 do 38 smo ovrgli tudi tezo, da naj bi PEG pri ekstrakciji z organskimi topili ostal v vodni fazi. TLC-ji vzorcev, kjer je bil PEG zagotovo prisoten so namreč podobni tem. To dokazujeta ekstrakta 1-butanola in etilacetata, ki kažeta na prisotnost PEG-a v vzorcih. PEG se je verjetno ekstrahiralo v organsko fazo skupaj s preučevanimi spojinami. Na sliki 36 je TLC izveden na celulozni plošči z mobilno fazo (6). Ločba je zelo slaba, lise se vlečejo in so razmazane. Zato je verjetno krivec PEG ali pa so to polimeri procianidinov na celulozni plošči.

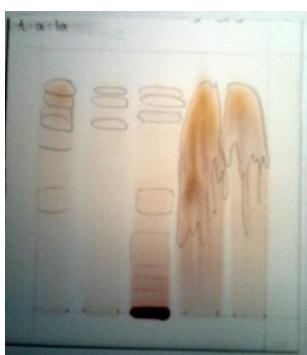


Slika 33: MF(3)

silikagela na način, da se zasede močna vezavna mesta in se tako zmanjša retanca spojin vzorca. S TLC-ji na sliki od 33 do 38 smo ovrgli tudi tezo, da naj bi PEG pri ekstrakciji z organskimi topili ostal v vodni fazi. TLC-ji vzorcev, kjer je bil PEG zagotovo prisoten so namreč podobni tem. To dokazujeta ekstrakta 1-butanola in etilacetata, ki kažeta na prisotnost PEG-a v vzorcih. PEG se je verjetno ekstrahiralo v organsko fazo skupaj s preučevanimi spojinami. Na sliki 36 je TLC izveden na celulozni plošči z mobilno fazo (6). Ločba je zelo slaba, lise se vlečejo in so razmazane. Zato je verjetno krivec PEG ali pa so to polimeri procianidinov na celulozni plošči.



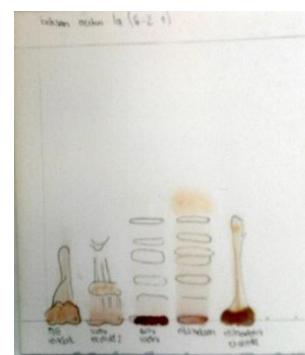
Slika 34: MF(4)



Slika 35: MF(5)



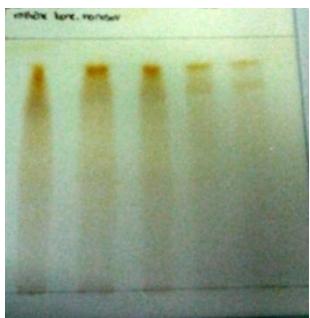
Slika 36: MF(6)



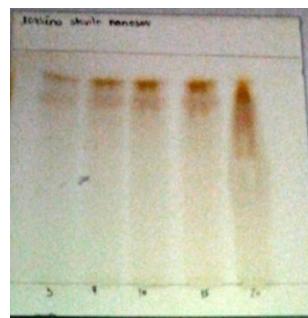
Slika 37: MF(7)

Najbolj nas je zanimal vzorec PEG ABE. Druge vzorce smo na TLC ploščo nanesli za primerjavo. Za najbolj optimalno mobilno fazo smo izbrali mobilno fazo 5, ker so pri izbiri primerne koncentracije za vzorec PEG ABE nastale vidne lise in niso nastali repi. Uporaba ostalih mobilnih faz ni ustrezala za nadaljnjo uporabo za preparativno TLC, saj smo pri

vzorcu PEG ABE dobili raztegnjene lise z dolgimi repi. V mobilni fazi smo nato razvili TLC ploščo z različnimi določenimi koncentracijami (slika 38). Po določitvi koncentracije smo nato razvili še TLC ploščo z različnim številom nanosov koncentracije (slika 39). Tako smo preverili vpliv nanosa določene koncentracije in število nanosov vzorca. Ugotovili smo, da je treba določeno koncentracijo nanesti na TLC ploščo z večjim številom nanosov in ne naenkrat.



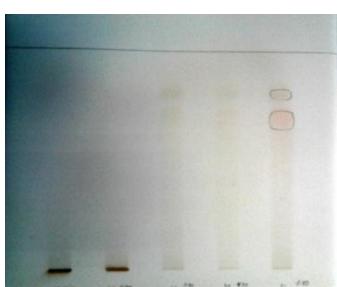
Slika 38: Različne koncentracije nanosov



Slika 39: Različno število nanosov enake koncentracij

Kljub temu, da smo z izbiro stacionarne faze, mobilne faze in orositvenega reagenta za tanine pričakovali uspešno ločbo in detekcijo, ki pa je kljub več variacijam izvedbe poskusov ni bilo, smo delo nadaljevali na preparativni TLC, saj smo tako lahko s pomočjo nadaljnje analize na HPLC podrobnejše preverili uspešnost separacije TLC za vzorec PEG ABE. Kasneje se je izkazalo, da smo prisotne spojine ločevali z neprimerno metodo za njihovo strukturo, ker smo imeli drugačne domneve o sestavi PEG ABE.

5.3.4.2 Preparativna TLC

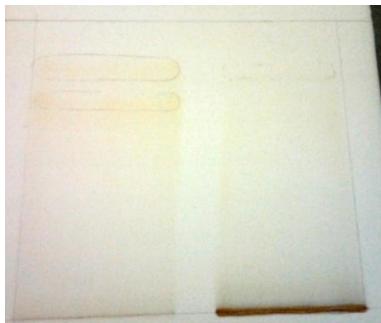


Nanašali smo različne koncentracije vzorca suhega vodnega izvlečka in PEG ABE (slika 38).

Slika 40: 1.–2. lisa vodni suhi izvleček, 3.–5. lisa PEG ABE od leve proti desni

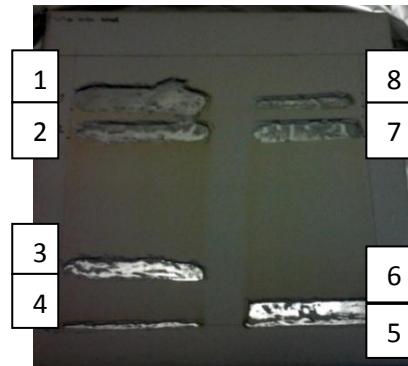
Za nadaljevanje dela na preparativni TLC smo se odločili, da mora biti koncentracija nanesenega vzorca primerljiva lisi 5, saj so lise najbolje vidne. Suhi vodni izvleček je potoval le po površini preparativne plošče, kar smo opazili pri odstranjevanju lise. To je

dobro vidno tudi na sliki 41, kjer opazimo, da so se spojine zadrževale na stacionarni fazi po celotni poti potovanja.



Slika 41: Razvit in orošen preparativni TLC – lisa 1

PEG izvleček, lisa 2 vodni suhi izvleček



Slika 42: Odstranjen silikagel na mestu nastalih lis

Iz preparativnega TLC-ja (slika 40) smo odstranili najprej lise, ki smo jih videli pod UV lučko (1, 2, rahlo vidna tudi lisa 8). Za primerjavo z liso 2 smo odstranili liso 7. Liso 3 smo odstranili, da bi dobili podatek, katere spojine imajo nizko retenco. Odstranili smo tudi področja nanosa vzorcev, da bi dobili podatke, kaj je ostalo na startu. Liso 6 smo odstranili, ker se je začetna lisa razvlekla do višine 1,5 cm in nas je zanimalo kje je vzrok oz. ali so za to krive spojine.

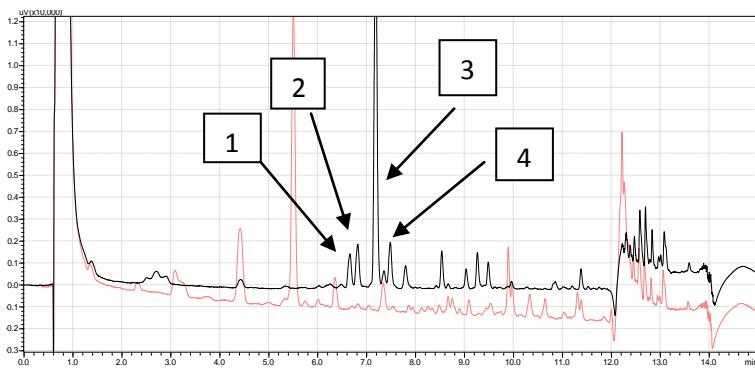
5.3.4.3 Analizna HPLC

Določeni vrhovi na kromatogramih posameznih lis iz TLC-ja so izstopali, vendar smo ob podrobnejšem ogledu kromatogramov našli ostale vrhove spojin v šumu (glej sliki 43 in 44). Osredotočili smo se na rezultate preparativne TLC za vzorec PEG ABE. Izgube, ki so prikazane v preglednici XX smo računali za TLC liso 2, ker je na kromatogramu PEG ABE vseboval najvišji vrh, ki nas je tudi najbolj zanimal. Preračunali smo na iste koncentracije vzorcev. Oznake vrhov so vidne na sliki 42.

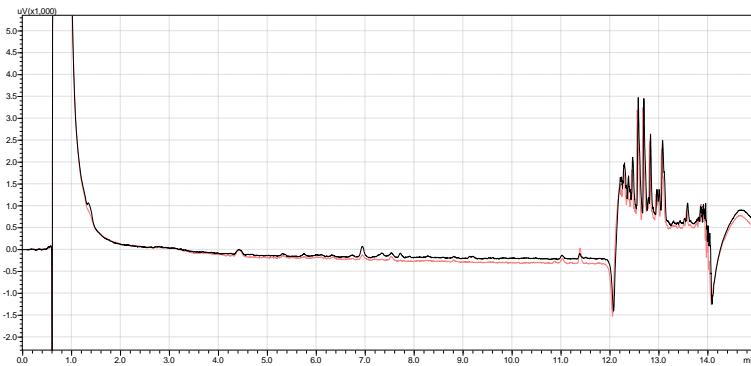
Preglednica XX: Izračun izgub pri izvedbi preparativne TLC

Št. vrha	PEG ABE		TLC lisa 2		Izkoristek (%)
	Rt	AUC	Rt	AUC	
1	6,671	890095	6,658	7219	0,81
2	6,831	1221675	6,819	9175	0,75
3	7,188	8220280	7,185	252274	2,97
4	7,499	2125050	7,483	9677	0,44

Na sliki 41 je vidno, da smo dosegli separacijo določenih spojin s TLC, vendar pa so bile izgube za uporabo teh frakcij za nadaljnjo separacijo prevelike.



Slika 43: Primerjava lise 1 in lise 2 na preparativni TLC

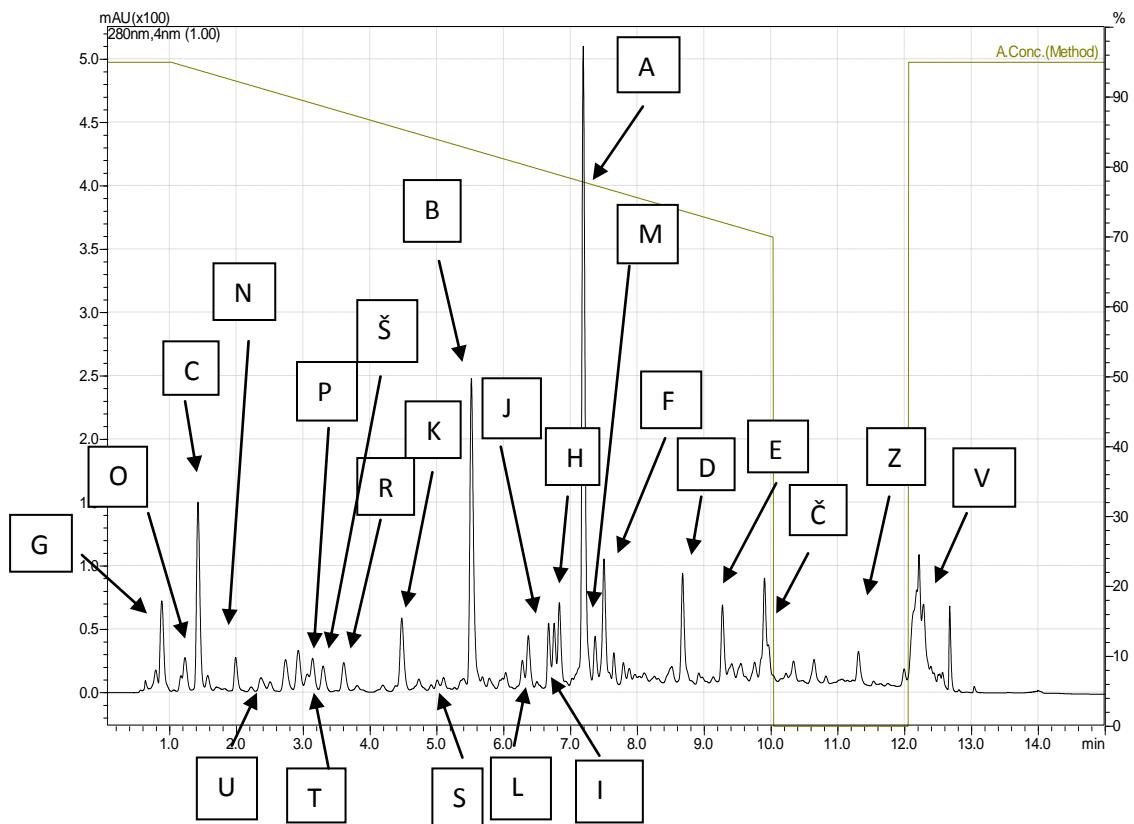


Slika 44: Primerjava lise 3 in 4 na preparativni TLC

Slika 44 po pričakovanjih kaže na to, da so spojine, ki so nas zanimali potovale z mobilno fazo in niso ostale na dnu.

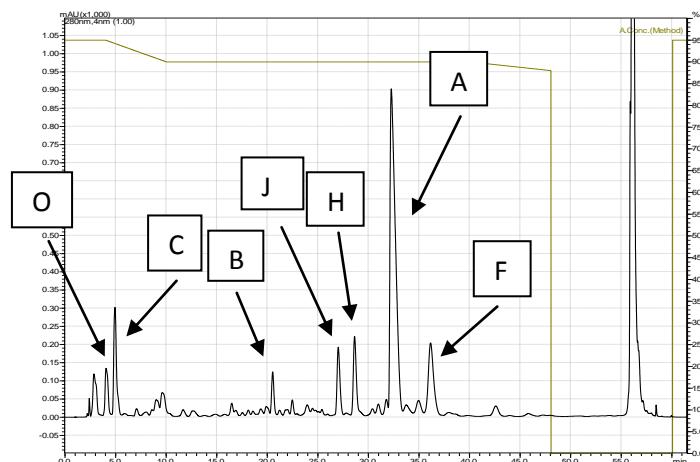
5.3.5 'Flash' kolonska kromatografija

Ker je normalnofazna kromatografija pokazala obetajoče rezultate separacije pri TLC, vendar slabe izkoristke, smo se odločili za bolj avtomatizirano zbiranje frakcij, kar je manj zamudno in učinkovitejše zaradi večje kapacitete kolone in pretoka mobilne faze s pomočjo črpalke, kjer kapilarne sile in PEG nimajo tako velikega vpliva. Spreminjali smo lahko tudi mobilne faze med samim procesom. Dobljene frakcije smo nato analizirali s pomočjo HPLC-ja.

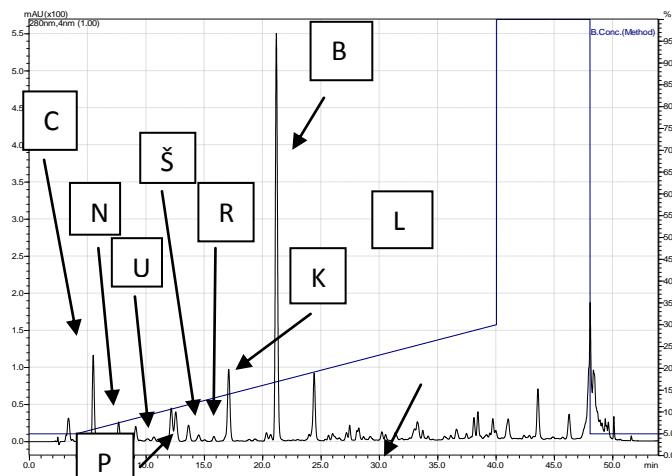


Slika 45: Kromatogram PEG ABE

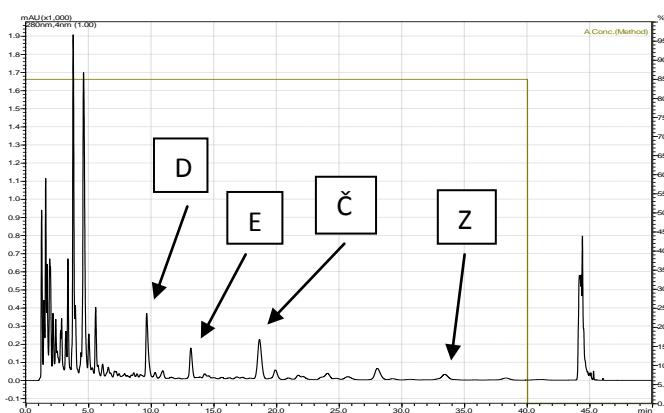
Po primerjavi vseh kromatogramov dobljenih frakcij smo se odločili za določene frakcije za nadaljnjo analizo na MS. Odločali smo se glede na to, da je bilo določene spojine čim več (izstopajoč vrh) in da je bil vrh čim bolj oster in ločen od drugih. S puščicami in črkami od A do Z smo označili vrhove po velikosti od največjega do najmanjšega, in sicer tiste, ki so nas zanimali pri določenih frakcijah. Optimizirane HPLC metode so navedene v podpoglavlju 4.4 Analizna HPLC. Za vsako frakcijo posebej smo prilagodili metodo zato, da smo dobili čim večji razmik med vrhovi.



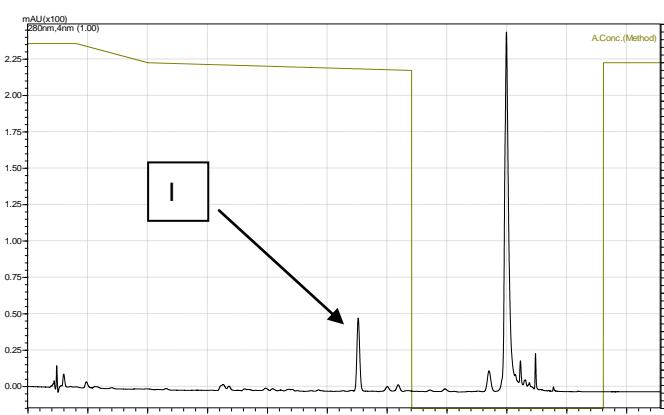
Slika 46: Optimizirana metoda za FR 21



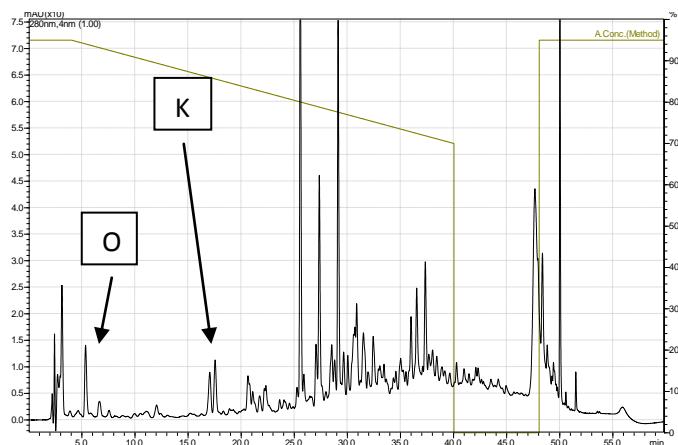
Slika 47: Optimizirana metoda za FR 8



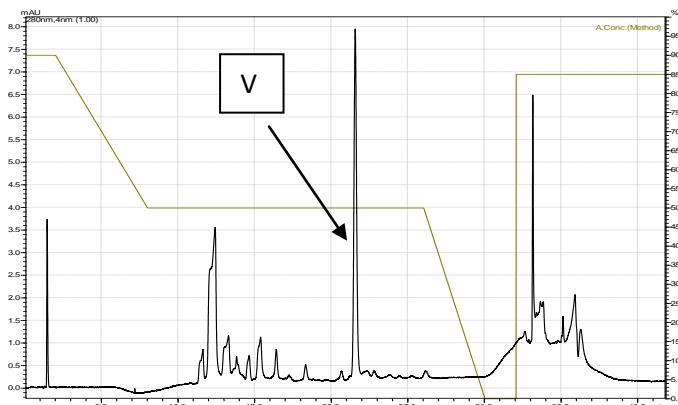
Slika 48: Optimizirana metoda za FR 17



Slika 49: Optimizirana metoda za FR 43



Slika 50: Optimizirana metoda za FR 37



Slika 51: Optimizirana metoda za FR 133

5.4 Metoda identifikacije

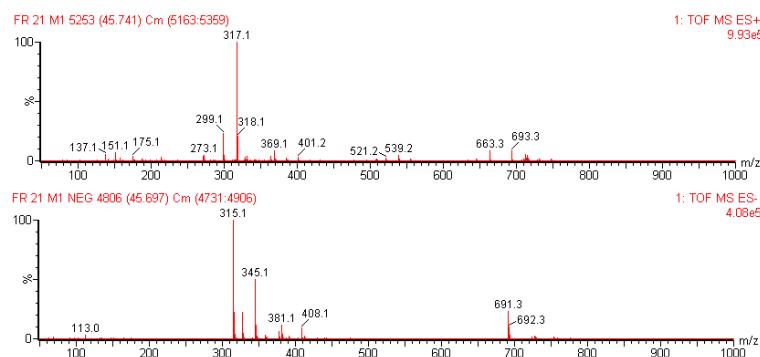
5.4.1 LC/MS

S pomočjo LC/MS, ki je bila glavna metoda za identifikacijo, smo identificirali spojine od A do Z. Na podlagi dobljenih masnih spektrov v ESI⁻ in ESI⁺ smo določili fragmente, ki so ustrezali posamezni spojini. Določeni fragmenti so bili prisotni kot nečistote drugih oz. sosednjih vrhov, kar smo ugotovili s pomočjo funkcij programa masnega spektra.

5.4.1.1 Spojine A, D, E in I

Ugotovili smo, da te spojine spadajo v skupino lignanov.

5.4.1.1.1 Spojina A = taksiresinol

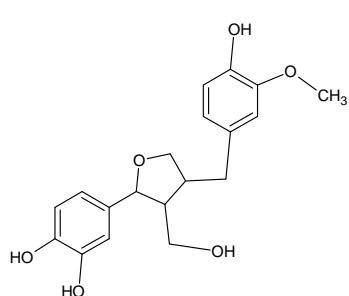


Slika 52: Masni spekter v ESI– in ESI+ spojine A

Preglednica XXI: Fragmenti spojine A v ESI– in ESI+

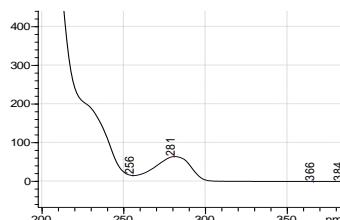
ESI–	ESI+
345: [M – H]–	329: [M – H ₂ O] ⁺
327: [M – H ₂ O] [–]	317: [M – OCH ₃] ⁺
315: [M – OCH ₃] [–]	299: [M – OCH ₃ – H ₂ O] ⁺
	273: [M – C ₃ H ₆ O ₂] ⁺
	151:
	137:

Na podlagi fragmentov smo predlagali strukturo (slika 53). Taksiresinol ($C_{19}H_{22}O_6$) na



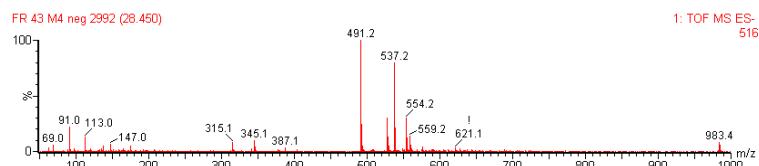
masni analizi daje molekulski vrh pri 345 Da v negativnem. Fragmenti masnega spektra taksiresinola, ki smo jih obravnavali pri ugotavljanju strukture so vidni na sliki 50 in prikazani v preglednici XXI. Na sliki 54 je prikazan UV-VIS absorbcijski spekter te spojine z absorbcijskima maksimumoma pri približno 220 nm in 281 nm.

Slika 53: Struktura spojine A



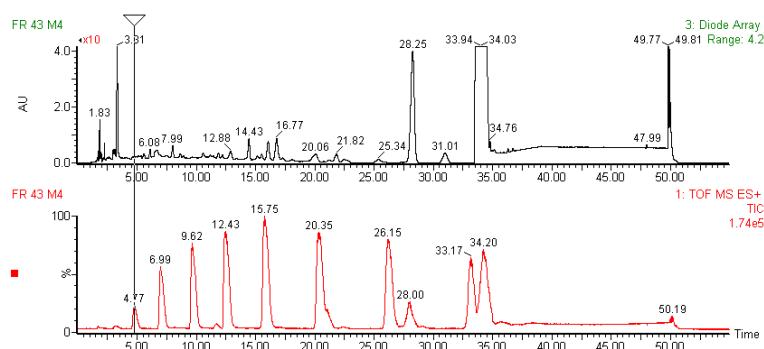
Slika 54: UV-VIS spekter spojina A

5.4.1.1.2 Spojina I = 7-(2-metil-3,4-dihidroksitetrahidropiran-5-iloksi)-taksiresinol



Slika 55: Masni spekter v ESI– spojine I

V frakciji 43 smo opazili prisotnost PEG-a s tem, da so številni fragmenti v tej frakciji pripadali molekulskim vrhovom oz. fragmentom PEG-a glede na m/z. Razvidni so bili samo v ESI+, kot prikazuje slika 56.



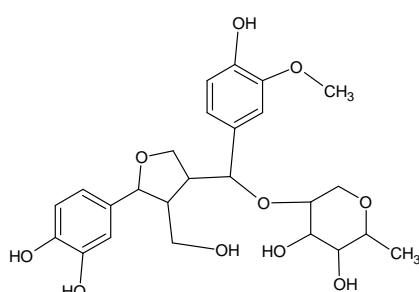
Slika 56: Kromatogram z UV-VIS in masnim (ESI+) detektorjem frakcije 43

Preglednica XXII: Fragmenti spojine I v ESI–

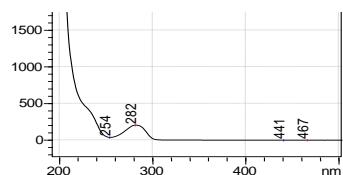
ESI–
983: [2M – H]–
537: [M + HCOOH]–
491: [M – H]–
345: [M – C ₆ H ₁₁ O ₄]–
315: [M – OCH ₃]–

Na podlagi fragmentov smo določili strukturo (slika 57). 7-(2-metil-3,4-dihidroksi tetrahidropiran-5-iloksi)taksiresinol ($C_{25}H_{32}O_{10}$) na masni analizi daje molekulski vrh pri

491 Da v negativnem. Fragmenti masnega spektra derivata taksiresinola, ki smo jih obravnavali pri ugotavljanju strukture so vidni na sliki 55 in prikazani v preglednici XXII. Na sliki 58 je prikazan UV-VIS absorbcijski spekter te spojine z absorbcijskima maksimumoma pri približno 220 nm in 282 nm.

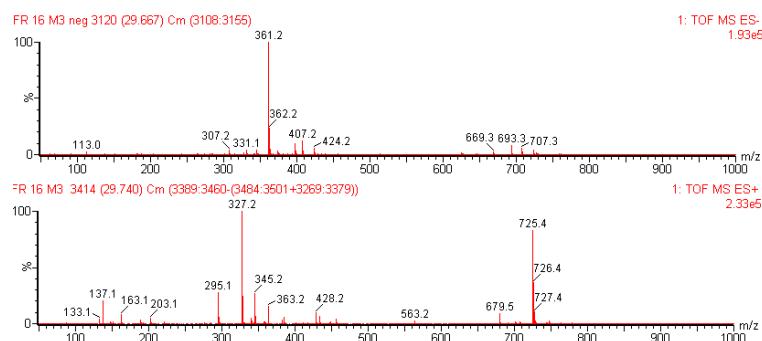


Slika 57: Struktura spojine I



Slika 58: UV-VIS spekter spojine I

5.4.1.1.3 Spojina D = sekoizolariciresinol

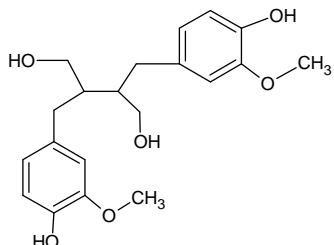


Slika 59: Masni spekter v ESI– in ESI+ spojine D

Preglednica XXIII: Fragmenti spojine D v ESI– in ESI+

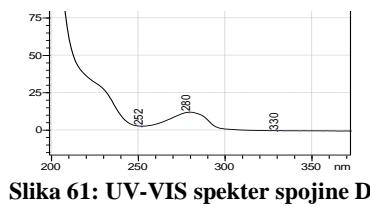
ESI–	ESI+
723: $[2M - H]^-$	725: $[2M + H]^+$
693: $[2M - OCH_3]^-$	363: $[M + H]^+$
407: $[M + HCOOH]^-$	345: $[M - H_2O]^+$
361: $[M - H]^-$	327: $[M - 2H_2O]^+$
343: $[M - H_2O]^-$	295: $[M - 2H_2O - CH_3OH]^+$
331: $[M - OCH_3]^-$	203:
	163:
	137:

Na podlagi fragmentov smo predlagali strukturo (slika 60). Sekoizolariciresinol ($C_{20}H_{26}O_6$) na masni analizi daje molekulski vrh pri 363 Da v pozitivnem. Fragmenti masnega spektra



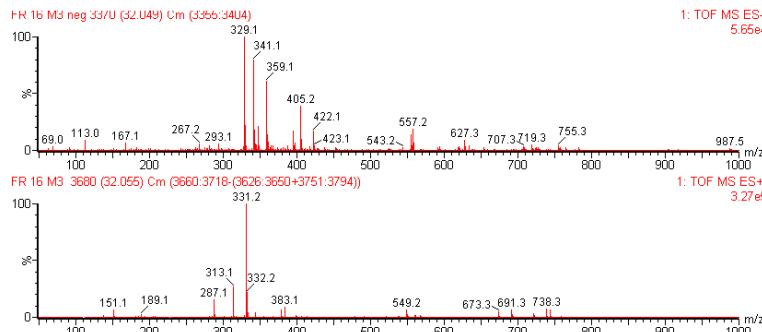
Slika 60: Struktura spojine D

sekoizolariciresinola, ki smo jih obravnavali pri ugotavljanju strukture so vidni na sliki 59 in prikazani v preglednici XXIII. Na sliki 61 je prikazan UV-VIS absorbcijski spekter te spojine z absorbcijskima maksimumoma pri približno 220 nm in 280 nm.



Slika 61: UV-VIS spekter spojine D

5.4.1.1.4 Spojina E = lariciresinol

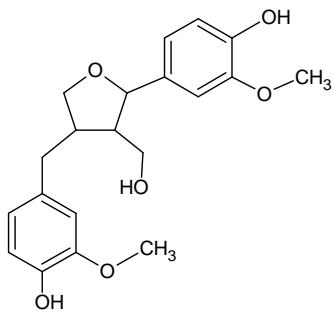


Slika 62: Masni spekter v ESI– in ESI+ spojine E

Preglednica XXIV: Fragmenti spojine E v ESI– in ESI+

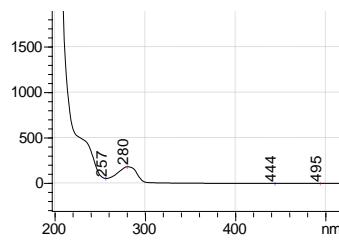
ESI–	ESI+
719: $[2M - H]^-$	721: $[2M + H]^+$
405: $[M + HCOOH]^-$	691: $[2M - OCH_3 + H]^+$
359: $[M - H]^-$	673: $[2M - OCH_3 - H_2O + H]^+$
341: $[M - H_2O]^-$	361: $[M + H]^+$
329: $[M - OCH_3]^-$	331: $[M - OCH_3 + H]^+$
	313: $[M - OCH_3 - H_2O + H]^+$
	287: $[M - C_3H_6O_2]^+$

Na podlagi fragmentov smo predlagali strukturo (slika 63). Lariciresinol ($C_{20}H_{24}O_6$) na



masni analizi daje molekulski vrh pri 359 Da v negativnem. Fragmenti masnega spektra lariciresinola, ki smo jih obravnavali pri ugotavljanju strukture so vidni na sliki 62 in prikazani v preglednici XXIV. Na sliki 64 je prikazan UV-VIS absorbcijski spekter te spojine z absorbcijskima maksimumoma pri približno 220 nm in 280 nm.

Slika 63: Struktura spojine E

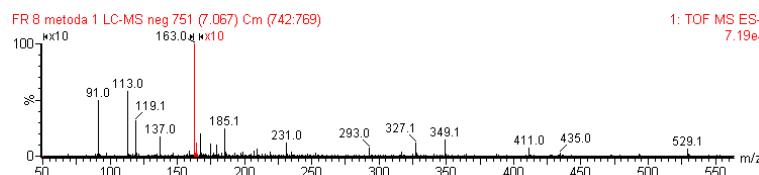


Slika 64: UV-VIS spekter spojine E

5.4.1.2 Spojine B, C, G, O, Š in U

Spojine so fenolne kisline, zato so bile vidne samo v ESI-. Določene spojine smo potrdili še s standardom. Vanilinsko kislino pa smo dokazali samo s standardom.

5.4.1.2.1 Spojina B = p-kumarna kislina (3-(4-hidroksifenil)-2-propenojska kislina)



Slika 65: Masni spekter v ESI- spojine B

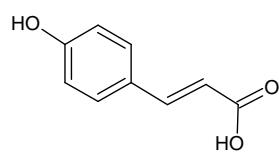
Preglednica XXV: Fragmenti spojine B v ESI-

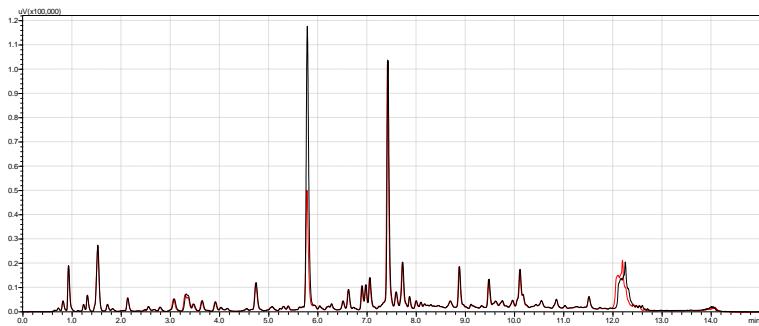
ESI-
163: $[M - H]^-$
119: $[M - HCOOH]^-$

Na podlagi fragmentov smo predlagali strukturo (slika 66). Para-kumarna kislina ($C_9H_9O_3$)

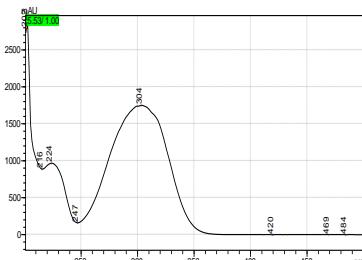
na masni analizi daje molekulski vrh pri 163 Da v negativnem. Fragmenti masnega spektra p-kumarne kisline, ki smo jih obravnavali pri ugotavljanju strukture so vidni na sliki 65 in prikazani v preglednici XXV.

Slika 66: Struktura spojine B

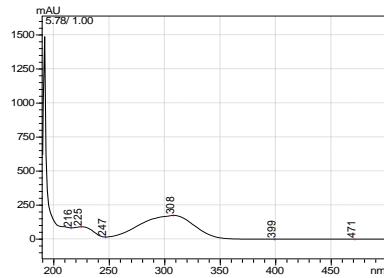




Slika 67: Primerjava kromatograma PEG ABE in kromatograma PEG ABE z dodatkom standarda p-kumarne kisline



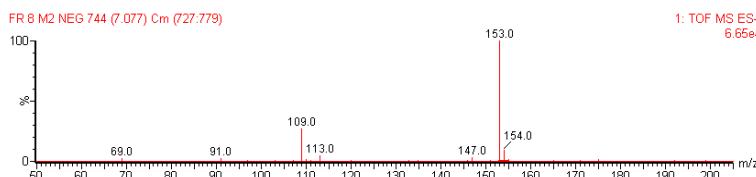
Slika 68: UV-VIS spekter standarda p-kumarne kisline



Slika 69: UV-VIS spekter PEG ABE

S primerjavo kromatogramov ter UV-VIS spektrov PEG ABE in PEG ABE s standardom p-kumarne kisline (slike 67, 68 in 69) smo ugotovili, da le-ti pripadajo isti spojini. Na istem mestu smo opazili tudi fragmente spojine, ki bi lahko bila flavonoid estersko vezan s p-kumarno kislino, vendar nam ga ni uspelo identificirati. To dokazuje tudi podatek, da se je pri tiolizni reakciji vrh p-kumarne kisline zmanjšal pri Rt 5,51 min, kar pomeni, da gre za razpad hidrolizirajočega tanina. V kromatogramu pa se je povečal vrh v bližini spojine Č, ki pa ga v MS nismo zasledili. S pomočjo poznane koncentracije standarda in primerjave površin pod krivuljo smo izračunali koncentracijo spojine v vzorcu PEG ABE, ki vsebuje 0,037 mg p-kumarne kisline/10 mg vzorca oz. 0,37 %.

5.4.1.2.2 Spojina C = protokatehajska kislina (3,4-dihidroksibenzojska kislina)

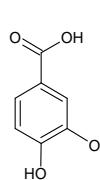


Slika 70: Masni spekter v ESI– spojine C

Preglednica XXVI: Fragmenti spojine C v ESI–

ESI–
153: [M – H]–
109: [M – COOH]–

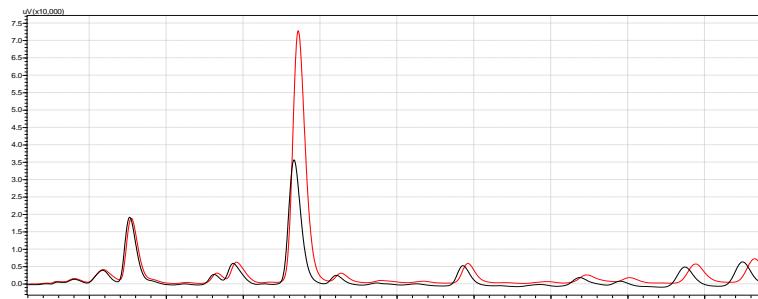
Na podlagi fragmentov smo predlagali strukturo (slika 71). Protokatehajska kislina



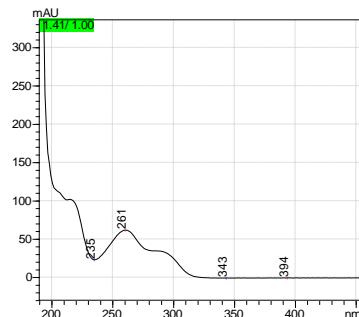
(C₇H₆O₄) na masni analizi daje molekulski vrh pri 153 Da v negativnem.

Fragmenti masnega spektra protokatehajske kisline, ki smo jih obravnavali pri ugotavljanju strukture so vidni na sliki 70 in prikazani v Preglednici XXVI.

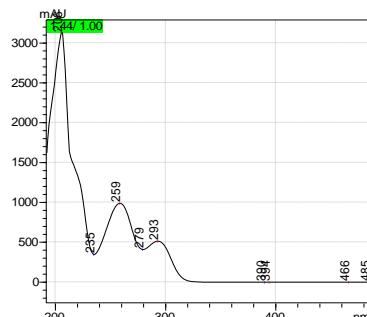
Slika 71: Struktura spojine C



Slika 72: Primerjava kromatograma PEG ABE in kromatograma PEG ABE z dodatkom standarda protokatehuične kisline



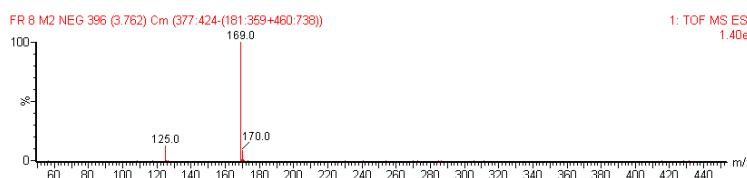
Slika 73: UV-VIS spekter PEG ABE



Slika 74: UV-VIS spekter standarda protokatehuične kisline

S primerjavo kromatogramov ter UV-VIS spektrov PEG ABE in PEG ABE s standardom protokatehajske kisline (slike 72, 73 in 74) smo ugotovili, da le-ti pripadajo isti spojini. S pomočjo poznane koncentracije standarda in primerjave površin pod krivuljo smo izračunali koncentracijo spojine v vzorcu PEG ABE, ki vsebuje 0,077 mg protokatehajske kisline/10 mg vzorca oz. 0,77 %.

5.4.1.2.3 Spojina G = galna kislina (3,4,5-trihidroksibenzojska kislina)

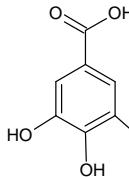


Slika 75: Masni spekter v ESI- spojine G

Preglednica XXVII: Fragmenti spojine G v ESI-

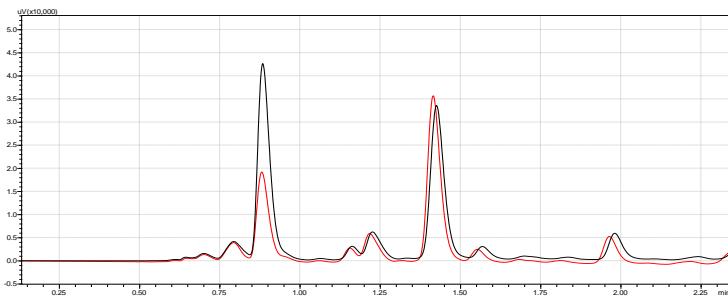
ESI-
169: [M – H]–
125: [M – COOH]–

Na podlagi fragmentov smo predlagali strukturo (slika 76). Galna kislina ($C_7H_6O_5$) na

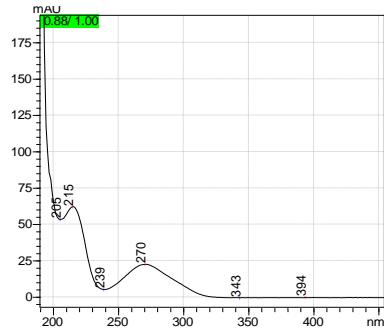


masni analizi daje molekulski vrh pri 169 Da v negativnem. Fragmenti masnega spektra galne kisline, ki smo jih obravnavali pri ugotavljanju strukture so vidni na sliki 75 in prikazani v preglednici XXVII.

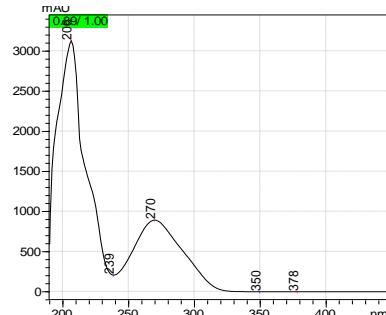
Slika 76: Struktura spojine G



Slika 77: Primerjava kromatograma PEG ABE in kromatograma PEG ABE z dodatkom standarda galne kisline



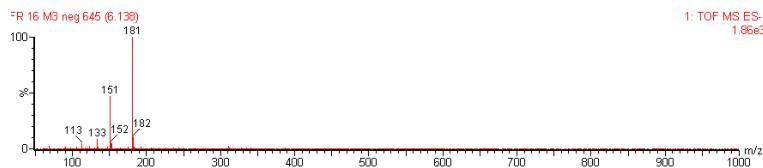
Slika 78: UV-VIS spekter PEG ABE



Slika 79: UV-VIS spekter standarda galne kisline

S primerjavo kromatogramov ter UV-VIS spektrov PEG ABE in PEG ABE s standardom galne kisline (slike 77, 78 in 79) smo ugotovili, da le-ti pripadajo isti spojini. S pomočjo poznane koncentracije standarda in primerjave površin pod krivuljo smo izračunali koncentracijo spojine v vzorcu PEG ABE, ki vsebuje 0,025 mg galne kisline/10 mg vzorca oz. 0,25 %.

5.4.1.2.4 Spojina O = homovanilična kislina (2-(4-hidroksi-3-metoksibenzen)-ocetna kislina)

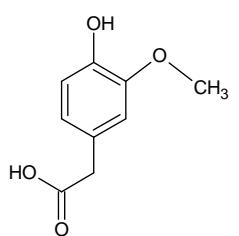


Slika 80: Masni spekter v ESI– spojine O

Preglednica XXVIII: Fragmenti spojine O v ESI–

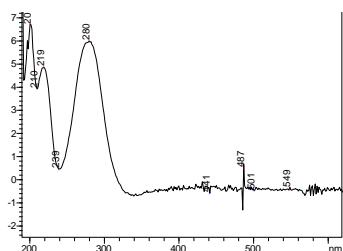
ESI–
151: $[M - OCH_3]^-$ <chem>Oc1ccc(cc1)C(O)C(=O)O</chem>
133: $[M - OCH_3 - H_2O]^-$ <chem>O=C1=CC=CC=C1</chem>
123: $[M - C_2H_2O_2]^-$ <chem>Oc1ccccc1OC</chem>

Na podlagi fragmentov smo predlagali strukturo (slika 81). Homovanilična kislina ($C_9H_{10}O_4$) na masni analizi daje molekulski vrh pri 181 Da v negativnem.



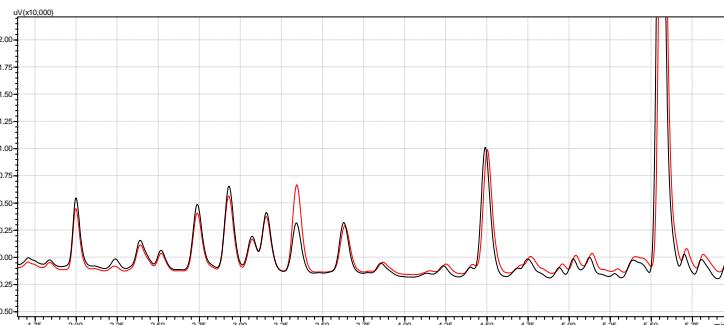
Fragmenti masnega spektra homovanilične kisline, ki smo jih obravnavali pri ugotavljanju strukture so vidni na sliki 78 in prikazani v preglednici XXVIII. Na sliki 82 je prikazan UV-VIS absorbcijski spekter te spojine z absorbcijskima maksimumoma pri približno 219 nm in 280 nm.

Slika 81: Struktura spojine O

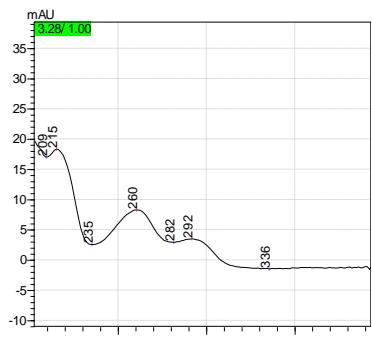


Slika 82: UV-VIS spekter spojine O

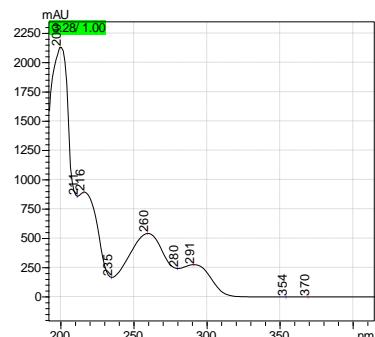
5.4.1.2.5 Spojina Š = vanilinska kislina (4-hidroksi-3-metoksibenzojska kislina)



Slika 83: Primerjava kromatograma PEG ABE in kromatograma PEG ABE z dodatkom standarda vanilinske kisline

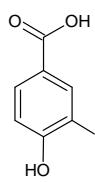


Slika 84: UV-VIS spekter PEG ABE



Slika 85: UV-VIS spekter standarda vanilinske kisline

S primerjavo kromatogramov ter UV-VIS spektrov ABE in ABE s standardom vanilinske



kisline (slike 83, 84 in 85) smo ugotovili, da le-ti pripadajo isti spojini. S pomočjo poznane koncentracije standarda in primerjave površin pod krivuljo smo izračunali koncentracijo spojine v vzorcu PEG ABE, ki vsebuje 0,0106 mg vanilinske kisline/10 mg vzorca oz. 0,106 %.

Slika 86: Struktura vanilne kisline

5.4.1.2.6 Spojina U = p-hidroksibenzojska kislina

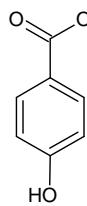


Slika 87: Masni spekter v ESI– spojine U

Preglednica XXIX: Fragmenti spojine U v ESI–

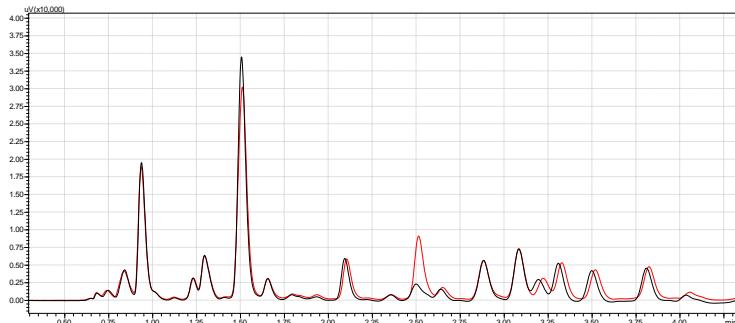
ESI–
137: [M – H]–
93: [M – COOH]–

Na podlagi fragmentov smo predlagali strukturo (slika 88). Para-hidroksibenzojska kislina

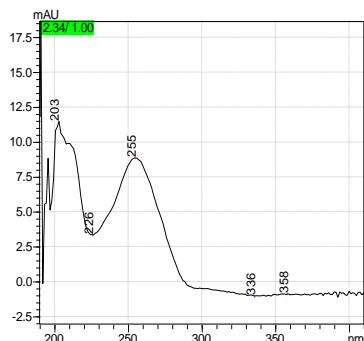


(C₇H₆O₃) na masni analizi daje molekulski vrh pri 137 Da v negativnem. Fragmenti masnega spektra p-hidroksibenzojske kisline, ki smo jih obravnavali pri ugotavljanju strukture so vidni na sliki 87 in prikazani v preglednici XXIX.

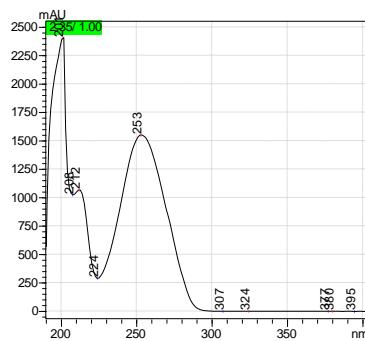
Slika 88: Struktura spojine U



Slika 89: Primerjava kromatograma PEG ABE in kromatograma PEG ABE z dodatkom standarda p-hidroksibenzojske kisline



Slika 90: UV-VIS spekter PEG ABE



Slika 91: UV-VIS spekter p-hidroksibenzojske kisline

S primerjavo kromatogramov ter UV-VIS spektrov PEG ABE in PEG ABE s standardom p-hidroksibenzojske kisline (slike 89, 90 in 91) smo ugotovili, da le-ti pripadajo isti spojini. S pomočjo poznane koncentracije standarda in primerjave površin pod krivuljo smo izračunali koncentracijo spojine v vzorcu PEG ABE, ki vsebuje 0,0104 mg p-hidroksibenzojske kisline/10 mg vzorca oz. 0,104 %.

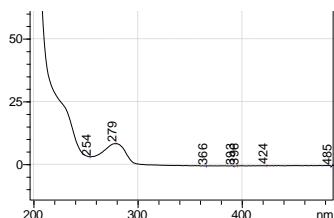
5.4.1.3 Spojine Č, H, J, K, S in T

Za spojine Č, H, J in K smo glede na fragmente masnega spektra sklepali, da so flavonoidi. Z injiciranjem standardov smo potrdili prisotnost spojin T in S.

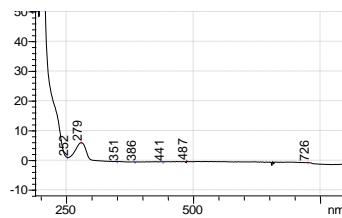
5.4.1.3.1 Spojini H in J

Spojini H in J sta si po fragmentih, ki smo jih dobili z MS, zelo podobni. Določeni fragmenti se ujemajo tudi s spojino Č, zato smo sklepali, da gre za polimere, kar se je tudi

potdilo pri tiolizni reakciji. Spojini H z Rt pri 6,82 min in J z Rt pri 6,66 min sta delno razpadli, kar je vidno iz zmanjšanja kromatografskih vrhov, pri spojnini Č z Rt pri 9,89 min pa se je vrh povečal, ker gre za monomer (glej podpoglavlje 5.3.1 Tiolizna degradacija procianidnih polimerov). UV spektra spojin sta prikazana na sliki 92 (spojina H) in 93 (spojina J). Absorpcijska spektra sta enaka, oba imata absorpcijski maksimum pri 220 nm in 279 nm.



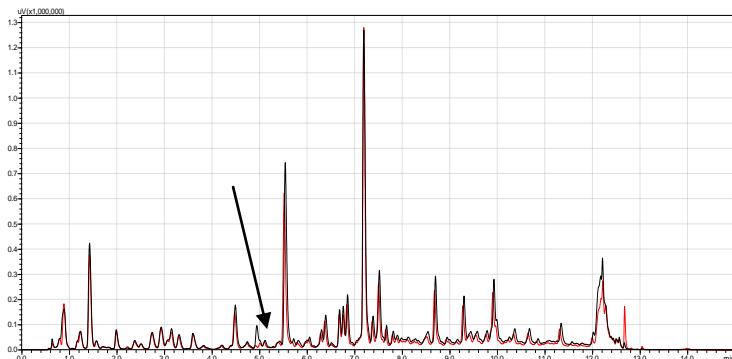
Slika 92: UV-VIS spekter spojine H



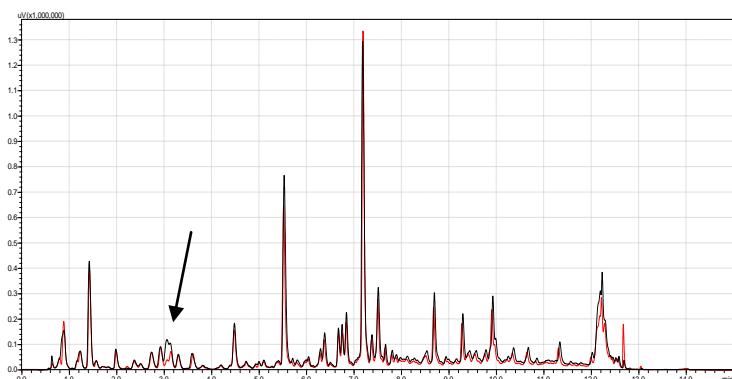
Slika 93: UV-VIS spekter spojine J

5.4.1.3.2 Spojini S in T

Glede na literaturo smo sklepali, da sta v PEG ABE prisotna katehin (spojina T) in epikatehin (spojina S) (16). Za potrditev njune prisotnosti smo uporabili HPLC in primerjali kromatograma PEG ABE in PEG ABE z dodanim standardom. Njuna prisotnost je bila potrjena s prekrivanjem kromatogramov, saj se je povečala površina kromatografskega vrha na mestu S in T (glej slike 94 in 95).

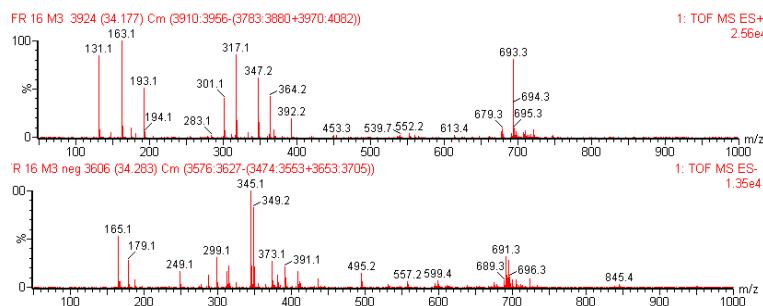


Slika 94: Primerjava kromatograma PEG ABE in kromatograma PEG ABE z dodatkom standarda epikatehina



Slika 95: Primerjava kromatograma PEG ABE in kromatograma PEG ABE z dodatkom standarda epikatehina

5.4.1.3.3 Spojina Č = katehin tetrametil eter



Slika 96: Masni spekter v ESI– in ESI+ spojine Č

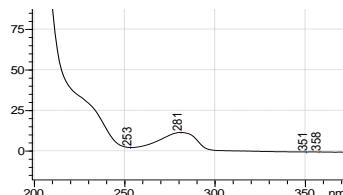
Preglednica XXX: Fragmenti spojine Č v ESI–

ESI–	ESI+
691: $[2M - H]^-$	693: $[2M + H]^+$
391: $[M + HCOOH]^-$	347: $[M + H]^+$
345: $[M - H]^-$	317: $[M - OCH_3]^+$
315: $[M - OCH_3]^-$	
179: $[M - C_9H_{10}O_3]^-$	
165: $[M - C_{10}H_{12}O_3]^-$	

Na podlagi fragmentov smo predlagali strukturo (slika 97). Katehin tetrametil eter ($C_{19}H_{22}O_6$) na masni analizi daje molekulski vrh pri 345 Da v negativnem.

Fragmenti masnega spektra katehin tetrametil etra, ki smo jih obravnavali pri ugotavljanju strukture so vidni na sliki 96 in prikazani v preglednici XXX. Na sliki 98 je prikazan UV-VIS absorbcijski spekter te spojine z absorbcijskima maksimumoma pri približno 220 nm in 281 nm.

Slika 97: Struktura spojine Č



Slika 98: UV-VIS spekter spojine Č

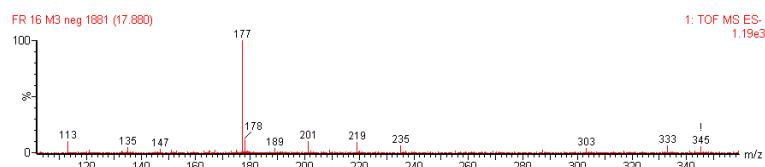
5.4.1.3.4 Spojina K

Glede na fragmente dobljene z masno spektrometrijo smo sklepali, da bi lahko ti pripadali dihidroksi-kumarinu (**4-etoksi-7-metoksikromen-2-on**), ki je derivat skopoletina (slika 99). Fragmenti, ki se ujemajo s to spojino so vidni na sliki 100 in prikazani v preglednici XXXI.

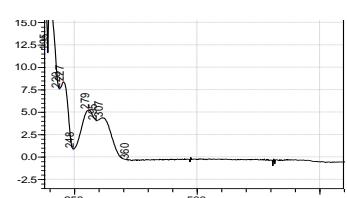
Slika 99: Struktura spojine K

Preglednica XXXI: Fragmenti spojine K v ESI-

ESI-
219: [M – H] ⁻
189: [M – OCH ₃] ⁻
177: [M – C ₃ H ₆] ⁻



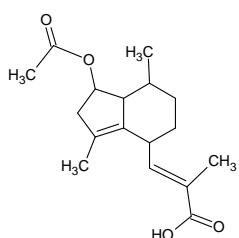
Slika 100: Masni spekter v ESI– spojine K



Na sliki 101 je prikazan UV-VIS spekter spojine, ki ima absorpcijski maksimum pri 279 nm in 307 nm.

Slika 101: UV-VIS spekter spojine K

5.4.1.4 Spojina Z

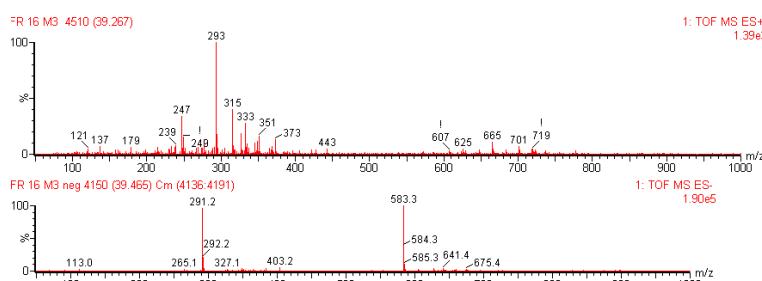


Glede na masni spekter in zaradi ujemanja fragmentov (glej preglednico XXXII in sliko 103) smo domnevali, da gre za **acetoksi-valerensko kislino**. Vendar zaradi premalo dokazov tega ne moremo zagotovo trditi. V literaturi nismo zasledili, v katerih rastlinah se nahaja.

Slika 102: Struktura spojine Z

Preglednica XXXII: Fragmenti spojine Z v ESI– in ESI+

ESI–	ESI+
583: [2M – H]–	585: [2M + H]+
291: [M – H]–	293: [M + H]+
	247: [M – HCOOH]+
	229: [M – COOH – C2H5O + Na]+



Slika 103: Masni spekter v ESI– in ESI+ spojine Z

5.4.1.5 Spojine F, L, M, N, P, R in V

Spojin F, L, M, N, P in R nam ni uspelo identificirati z nobeno od metod.

5.4.1.6 Ostale spojine

Dobili smo tudi rezultate plinske kromatografije PEG ABE, ki je nismo izvajali v okviru diplomske naloge. Z GC smo dokazali prisotnost hlapnih spojin v PEG ABE. Prikazane so v preglednici XXXIII.

Preglednica XXXIII: Preglednica spojin, identificiranih s pomočjo GC

Skupina	Ime spojin
monoterpen	p-cimen
fenolne spojine	maltol
	4-vinilgvajakol
	vanilin
	metilni ester vanilinske kisline
	homovanilična kislina
višji nasičeni maščobni alkoholi	dokosanol
višje nasičene maščobne kisline	miritinska kislina
	lignocerična kislina
	stearinska kislina
	lavrična kislina
višje nenasičene maščobne kisline	oleinska kislina

Prisotnost homovanilične kisline in vanilne kisline smo z dobljenimi GC rezultati dodatno potrdili.

6 SKLEP

Izvleček lubja navadne jelke s polietilenglikolom ne vsebuje v večini samo flavonoidov, kot smo pričakovali pred začetkom raziskovalnega dela, temveč tudi druge skupine spojin, predvsem lignane in fenolne kisline.

Pri testu prisotnosti in vsebnosti procianidinov po USP 35 nismo dobili ustreznih rezultatov. Vzrok za to je lahko, da test ni specifičen za procianidine v izvlečku lubja jelke, ampak za procianidine v Pknogenolu. Tudi naši vzorci so pridobljeni na drugačen način kot vzorec Pknogenola, kar lahko vpliva na občutljivost metode. Reagirale so lahko tudi druge spojine in smo pri določenih vzorcih dobili lažne pozitivne rezultate. Vendar se je izkazalo, da naj bi bili kljub temu v majhnih količinah prisotni v PEG ABE. S tiolizno reakcijo smo ugotovili, da so procianidini prisotni. Pri nekaterih kromatografskih vrhovih se je površina zmanjšala zaradi razpada procianidinov oz. povečala zaradi nastanka monomerov. Ta dokaz nam je bil v pomoč pri obdelavi rezultatov MS, saj smo lahko sklepali, kje v spektru so prisotni procianidini oz. monomeri le teh. Nismo pa zagotovo vedeli, ali so razpadle pri reakciji še katere druge spojine in smo zaradi tega lahko dobili lažno pozitivne rezultate. Zaporedna ekstrakcija z različno polarnostjo topil se za separacijo našega vzorca PEG ABE ni izkazala kot uspešna. Pri bolj nepolarnih topilih so bile prevelike izgube ($> 96\%$). Z večanjem polarnosti topil pa so se ekstrahirale večinoma vse spojine v enakem razmerju. Njihova ekstrahirana količina je naraščala s polarnostjo topil. Pri SPE metodi se je po analizi na HPLC aparaturi izkazalo, da smo ločili samo bolj polarne spojine od lipofilnih in s tem dobili dve frakciji, s čimer naš cilj ni bil dosežen, saj smo že z ustreznou metodo s sistemom HPLC na RP koloni raztegnili bolj polarne spojine, lipofilne pa so se izločile na koncu metode s 100 % acetonitrilom. Ker smo v vzorcu PEG ABE pričakovali prisotnost taninov, smo izvajali njim prilagojeno separacijsko metodo analizne TLC, vendar se je kasneje izkazalo, da smo imeli napačne domneve o sestavi. Kljub temu smo z metodo preparativne TLC dokazali uspešno separacijo določenih spojin, vendar s prenizkim izkoristkom ($< 3\%$).

Kot uspešna metoda separacije se je izkazala `flash` kolonska kromatografija, pri kateri smo z različnimi mobilnimi fazami ob lovljenju frakcij eluirali samo določene spojine. S pomočjo HPLC kromatogramov frakcij smo ocenili, kateri vrhovi glede na čistost in količino spojine ustrezajo za nadaljnjo analizo na MS. Z MS smo potrdili, da najvišji vrh v HPLC kromatogramu PEG ABE z Rt približno 7 min ne pripada flavonoidu, temveč sklepamo, da je to lignan. S pomočjo masnega spektra smo ugotovili, da je taksiresinol.

Drugi najvišji vrh na HPLC kromatogramu z Rt približno 5,8 min pripada p-kumarni kislini, ki je derivat cimetne kisline.

Spojine v PEG ABE, ki smo jim tudi določili strukturo pa pripadajo lignanom 7-(2-metil-3,4-dihidroksitetrahidropiran-5-iloksi)taksiresinolu, secolariciresinolu in lariciresinolu, fenolnim kislinam protokatehuični, galni, homovanilični, vanilni in p-hidroksibenzojski ter flavonoidu katehin tetrametiletru. S standardoma smo potrdili tudi prisotnost katehina in epikatehina. Za ostale spojine, ki so bile vidne v kromatogramu PEG ABE, smo imeli premalo trdnih dokazov za njihovo dejansko prisotnost oz. je bila njihova količina prenizka za določanje z občutljivostjo aparatur, ki so nam jo omogočale dostopne aparature.

Rezultati našega raziskovalnega dela prispevajo k boljšemu poznavanju, katere vrste spojin in katere spojine so prisotne v PEG ABE.

Za nadaljnje raziskave predlagamo, da se posamezno spojino izolira s pomočjo preparativne HPLC in potrdi oz. ovrže njen strukturo z jedrsko magnetno resonanco, ugotovi njen količino v izvlečku PEG ABE in nato še njen antioksidativno aktivnost.

7 LITERATURA

1. Packer, L., Rimbach, G. in Virgili, F., 1999. Antioxidant activity and biologic properties of procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, Pycnogenol. *Free Radical Biology & Medicine*; št. 27; str. 704–724.
2. Štrukelj, B., Kreft, S., Umek, A. in Janež, D., 2010. *Antioksidativni izvleček iz skorje jelke in smreke v PEG in njegovo pridobivanje*. Patent, Urad RS za intelektualno lastnino, Ljubljana.
3. Mechora, Š. in Kos, I., 2010. Srebrna kraljica gozdov. *Proteus, časopis za poljudno naravoslovje*, let. 72, št. 5, str. 206–210.
4. Navadna jelka (Abies alba Mill.): <http://www.gobe.si/Drevesa/AbiesAlba> (Dostopno na spletu 31.8.2012).
5. Batič, F., Wraber, T. in Turk, B., 2003. *Pregled rastlinskega sistema*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana.
6. Gričar, J. 2009. *Trajna raba lesa v kontekstu sonaravnega gospodarjenja z gozdovi, Vpliv debeline lubja in eksperimentalno povišanih temperatur na delovanje kambija - preliminarni rezultati*. str. 55–60.
7. Gornik Bučar, D., 2007. Izkoriščanje žagarskih dodatkov. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, št. 53, str. 127–137.
8. Zgradba debla jelke: <http://www.zrsss.si/~puncer/les/zgradba.htm> (Dostopno na spletu 8.10.2012)
9. Tišler, V., 1987. *Kemija lesa: Nerecenzirano študijsko gradivo*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Ljubljana.
10. Tišler, V., 1987. Kemija in uporaba lesnih skorij. *Letno poročilo za leto 1987*, VDO Biotehnična fakulteta, VTOZD za lesarstvo, Ljubljana.
11. Polanc, J. in Leban, I., 2004. *Les – zgradba in lastnosti*. Učbenik, Zveza lesarjev Slovenije, Ljubljana.
12. Fengel, D. in Wegener, G., 1989. Chemistry, ultrastructure, reactions. *Walter de Gruyter*, Berlin, New York, str. 58–258.
13. Pizzeghello, D., Zanella, A., Carletti, P. in Nardi S., 2006. Chemical in biological characterization of dissolved organic matter from silver fir and beech forest soils. *Chemosphere* 65, str. 190–200.

14. Lavrenčič, A. in Stibilj, V., 1999. Derivati cimetne kisline in lignin: Vsebost, struktura in lastnosti; Pregledni znanstveni članek. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerza v Ljubljani*, let. 74, št. 1.
15. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. in Bobilya, D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, str. 573–584.
16. Čajič, A., 2011. *Karakterizacija in poskus identifikacije komponent antioksidativnegaa ekstrakta lubja navadne jelke (Abies alba)*. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana.
17. Willför, S., Nisula, L., Hemning, J., Reunanen, M. in Holmban, B., 2004. Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 2: Knots and stemwood of fir species. *Holzorschung*, let. 58, št. 6, str. 650–659.
18. Willför, S. M., Smeds, A. I. in Holmbom, B. R., 2005. Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*, št. 1112 (2006), str. 64–77.
19. Weiss, M., Schmidt, J., Neumann, D., Wray, V., Christ, R. in Strack, D., 1999. Phenylpropanoids in mycorrhizas of Pinaceae. *Planta*, let. 28, št. 4, str. 491–502.
20. Khan, V. A. in Pentegova, V. A., 1988. Volatile components of oleoresin in *Abies alba*. *Chemistry of natural compounds*, let. 28, št. 2, str. 162–166.
21. Rowachol. *Navodila za uporabo*. Farmedica, 2004.
22. Erbaven fresh gel. *Navodila za uporabo*. Sanofarm, 2009.
23. Mariplant, trpotčev sirup za odrasle. *Navodila za uporabo*. Mariborske lekarne, 2012.
24. Sun, J., 2007. D-Limonene: safety and clinical applications. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, let. 12, št. 3, str. 259–264.
25. Yang, X., Li, S., Shen, Y. in Zhang, W., 2008. Phytochemical and biological studies of abies species. *Chemistry and biodiversity*, let. 5, št. 1, str. 56–81.
26. Bol'shakova, V. I., Demekova, L. I., Shmidt, E. N. in Pentegova, V. A., 1988. Neutral diterpenoids of oleoresins of five species of conifers Transcarpathia. *Chemistry of natural compounds*, let. 24, št. 6, str. 691–694.
27. Leibyuk, T. V., Shmidt, E. N. in Raldgin, V. A., 1986. Triterpenoids from *Abies alba* species X. Two new 3,4-secotriterpene acids from oleoresin of silver fir. *Chemistry of natural compounds*, let. 26, št. 6, str. 651–655.

28. Lisa, M., Holčapek, M., Rezanka, T. in Kabatova, N., 2007. High-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry and gas chromatography-flame ionisation detection characterization of $\Delta 5$ -polyenoic fatty acids in triacylglycerols from conifer seed oils. *Journal of chromatography A*, št. 1146 (2007), str. 67–77.
29. Bernards, M.A., 2002. Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany*, let. 80, št. 3, str. 227–240.
30. United States Pharmacopeial Convention. 2011. Dietary Supplements/Maritime Pine. *The United States Pharmacopoeia 35 (USP 35)*, str. 1380–1383.
31. Makkar, H. P. S., Siddhuraju, P. in Becker, K., 2007. Tannins. *Plant Secondary Metabolites Methods in Molecular Biology*, št. 393, str. 67–81.
32. Amarowicz, R. in Pegg, R.B., 2006. Content of proanthocyanidins in selected plant extract as determined via n-butanol/HCl hydrolysis and colorimetric assay or by HPLC – a short report. *Polish journal of food and nutrition sciences*, let. 15/56, št. 3, str. 319–322.
33. Jerez, M., Selga, A., Sineiro, J., Torres, J. L. in Núñez, M. J., 2007. A comparison between bark extracts from Pinus pinaster and Pinus radiata: Antioxidant activity and procyanidin composition. *Food chemistry*, let. 100, št. 2, str. 439–444.
34. Požgan, F. in Štefane, B., 2009. *Uvod v laboratorijsko organsko kemijo*. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, str. 79–85.
35. SPE: <http://www.sigmadlrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
(Dostopno na spletu 7.6.2012).
36. Sollner Dolenc, M. in Pečar, S., 2000. *Vaje iz farmacevtske kemije III; Druga dopolnjena izdaja, ponatis*. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana.
37. Vannilin assay.: <http://www.users.muohio.edu/hagermae/Vanillin%20Assay.pdf>
(Dostopno na spletu 7.6.2012).
38. Sarkar, S. K. in Howarth, R. E., 1976. Specificity of the vanillin test for flavanols. *J. Agric, Food Chemistry*, let. 24, str. 317–320.
39. Schofield, P., Mbugua, D. M. in Pell A. N., 2001. Analysis of condensed tannins; a review. *Animal Feed Science an Technology*, št. 91, str. 21–40.
40. Svete, J., 1999. *Preparativna organska kemija*. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana.