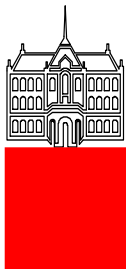


Univerza v Ljubljani

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo



Univerzitetni študijski program Kemija
Izbirni sklop analizna in anorganska kemija

Avtomatizirana analiza

Seminar 2010

Predavatelj: prof. dr. Boris Pihlar

Seminarska naloga je izdelana v okviru študijskih obvez dodiplomskega izbirnega predmeta *Avtomatizirana analiza* (30-0641). Delo ni lektorirano ali vsebinsko korigirano s strani predavatelja ali drugih univerzitetnih inštitucij. Avtor in inštitucija ne jamčita za pravilnost podatkov in navedb ter ne izključujeta možnosti, da so v objavljenem gradivu napake ali druge nepravilnosti.

Gradivo predstavljeno v tem delu je avtorska lastnina, oziroma last navedenih virov, iz katerih je bilo povzeto.

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

DOLOČITEV FENOLNIH SPOJIN IN NJIHOVIH
ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI V EKSTRAKTIH ERIGERON
ACRIS L. IN FARMACEVTSKIH SESTAVAH, Z PRETOČNO
INJEKCIJSKO ANALIZO IN DETEKCIJO Z INHIBIRANJEM
KEMILUMINESCENCE

Pripravila: Tina Bakarič
Mentor: Prof. Dr. Boris Pihlar

1. Uvod

Nalewajko-Sieliwoniuk s sodelavci, so odkrili, da fenolne spojine pridobljene iz rastlin zavirajo kemiluminescenco, povzročeno z reakcijo med luminolom in jodom. Prav te fenolne spojine, naj bi bile ključne za antioksidativne lastnosti določenih rastlin. Pri delu so uporabljali novo razvito metodo, in sicer pretočno injekcijsko kemiluminiscenčno metodo, kjer so za detekcijo merili intenzivnost kemiluminescence.

Rastlina *Erigeron acris* L. ali modri bolšjak iz družine Asteraceae (nebinovke) je dveletnica ali trajnica. Uporabljali so jo za lajšanje zobnih bolečin in artritis. Fitokemične študije so razkrile, da se v rastlini pojavljajo polifenolne spojine. Iz rastline so izolirali flavonoidne aglikone (kvercetin, luteolin, apigenin, kaempferol), luteolin 7-O-glikozid, scuteralin in erigerosid in te nato uporabili za nadaljnjo analizo.

Flavonoidni aglikoni: Aglikoni flavonoidnih glikozidov so derivati flavana. Flavan je osnovna struktura številnih in zelo razširjenih naravnih barvil, tako imenovanih flavonov in antocijanov. Derivati flavana so prosti ali pa vezani v glikozide. (1,4)

Antioksidanti delujejo tako, da preprečujejo poškodbe celičnih molekul zaradi oksidacije. Z oksidoredukcijskimi reakcijami antioksidanti nevtralizirajo posebno reaktivne proste radikale, ki nastanejo iz kisika in vodikovega peroksida v običajnih fizioloških razmerah. Nekatere od teh prostih radikalov, kot so superoksidni anion ali peroksil (O_2^-), hidroksil (HO^\cdot), hidroperoksil (HOO^\cdot) in peroksinitril ($OONO^\cdot$, ki nastane po reakciji med dušikovim oksidom, NO, in superoksidnim anionom), imenujemo tudi **reaktivne kisikove zvrsti (ROS)**. B. Halliwell je formuliral definicijo antioksidantov kot: katerakoli snov ki, ko je prisotna v nizkih koncentracijah v primerjavi s koncentracijami oksidirane substrata, odločno zavlačuje ali prepreči oksidacijo tega substrata. Antioksidativna aktivnost je relativna predstava: odvisna je od vrste oksidativnega stresa in pa vrste oksidirajoče spojine. (10,11,12) Najbolj razširjene metode za določevanje antioksidativnih lastnosti so zagotovo spektrofotometrične. Na veljavi pa vse bolj pridobiva kemiluminescenca, saj je dovolj občutljiva in hitra metoda za določevanje antioksidativne aktivnosti. (1)

Kemiluminescenca (CL) je emisija svetlobe, ki se sprosti pri kemijski reakciji ob normalnih pogojih. O tovrstnem pojavu lahko govorimo, kadar eksotermna reakcija proizvaja molekule v elektronsko vzbujenem stanju. Ko se te molekule vračajo v osnovno stanje, sprostijo fotone (energijo v obliki svetlobe). To se največkrat dogaja v tekočem in trdnem agregatnem stanju. (3) V literaturi sta opisani dve glavni kemiluminiscenčni reakciji, direktna in indirektna.

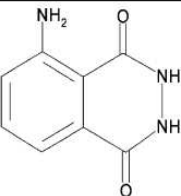
Direktna kemiluminescenca: $A + B \rightarrow [I]^* \rightarrow \text{PRODUKTI} + \text{SVETLOBA}$, kjer sta A in B reaktanta in je $[I]^*$ vzbujeno stanje. Reakcija z luminolom je primer take kemiluminescence. Pri indirektni kemiluminiscenci pa je intermediat neučinkovit oddajalec svetlobe, zato se prenese na drugo specijo (senzibilizator, F): $A + B \rightarrow [I]^* + F \rightarrow [F]^* \rightarrow F + \text{SVETLOBA}$.

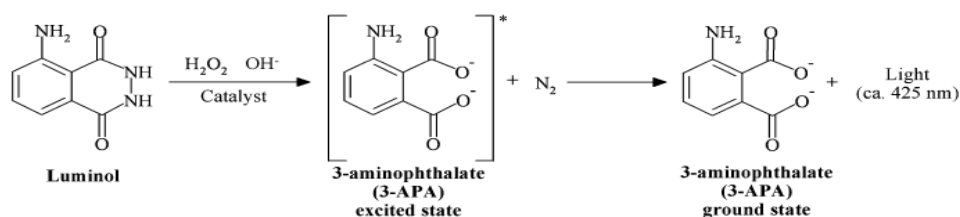
Obstajajo različne kemiluminogene spojine, toda za določitev antioksidativne aktivnosti se največkrat uporablja luminol. Raztopine luminola so občutljive na svetlobo in prisotnost kovinskih kationov, prav tako niso termično stabilne. Kemične in fizikalne lastnosti luminola so zbrane v tabeli 1.

Svetlobna pot, ki se pojavi pri oksidaciji luminola, je kompleksen proces in je odvisen od pH, temperature in ionske moči reakcijskega medija ter reaktivnih zvrsti prisotnih v raztopini. Luminol oksidirajo prosti radikali in ROS, ki povzročijo nastanek elektronsko vzbujenega 3-

aminoftalat dianiona (3-APA*), ta nato emitira svetlobo in se pri tem vrne v osnovno stanje (slika 1). (2)

Tabela 1 : kemične, fizikalne in toksikološke značilnosti luminola. (2)

Names	5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dione, <i>o</i> -aminophthalyl hydrazide, 3-aminophthalic hydrazide
Molecular and structural formula	
Molecular mass	177.16 amu
Melting point	319–320 °C
p <i>K</i> _{a1}	6.74
p <i>K</i> _{a2}	15.1
Solubility in water	<0.1 g/100 mL at room temperature
Physical properties	Yellow crystalline solid (grainy crystals)
General properties	Stable at room temperature, sensitive to light, combustible, incompatible with strong oxidizing agents, strong acids, strong bases, strong reducing agents, emits light on reaction with oxidizers (chemiluminescent)
Safety information and potential health effects	The toxicological properties have not been fully investigated in humans; anyway mucosa irritation has been described: eyes, skin, respiratory tract and gastrointestinal tract (with nausea, vomiting and diarrhea). No data available about chronic effects. More information available at The National Toxicology Program (The National Institute of Environmental Health Sciences, NC, USA) website http://ntp.niehs.nih.gov/index.cfm



Slika 1: Reakcijska shema kemiluminiscence luminola. (2)

Ta reakcija se uporablja za detekcijo pri analizah, ki merijo antioksidativno aktivnost, in sicer tako da se meri intenziteta emitirane svetlobe, ki se ob prisotnosti antioksidanta zmanjša. Nalewajko-Sieliwoniuk s sodelavci, so kemiluminiscenčno detekcijo uporabili s pretočno injekcijsko metodo (FIA), saj so tako skrajšali čas analize. Prav tako pa je bilo lažje preučevati zaviralni efekt antioksidantov na nestabilne kisikove zvrsti, ki imajo kratko življenjsko dobo (O_2^-). Za detekcijo antioksidativne aktivnosti, so kot prvi, uporabili sistem luminol-I2, jod je deloval kot oksidant. V različnih literaturah lahko najdemo uporabo tega sistema, toda ne za antioksidativne aktivnosti. (2)

Pretočno injekcijska analiza (FIA)

Pretočno injekcijske metode so rezultat segmentiranih pretočnih procedur, ki so jih na široko uporabljali v kliničnih laboratorijih, med leti 1960 in 1970, za rutinske avtomatske določitve specij v krvi in urinu. V teh sistemih je vzorec potoval skozi sistem do detektorja preko tekoče vodne raztopine, ki je vsebovala zračne mehurčke. Ti so služili, da so preprečili preveliko razpršitev vzorca, spodbujali turbulentno mešanje vzorca in reagentov in da so »drgnili« stene cevi ter tako preprečevali navzkrižno kontaminacijo med zaporednimi vzorci. Iznajditelji FIA so odkrili da se da vesm tem težavam izogniti s pravilno zasnovanim sistemom in se mešanje vzorca in reagentov zlahka realizira. Odprava zračnih mehurčkov je dala metodi veliko prednosti: 1) višja stopnja analiz (100-300vzorcev/uro); 2) povečan odzivni čas (manj kot 1min med injiciranjem vzorca in odzivom detektorja); 3) veliko hitrejši čas zagona in prav tako čas ustavitve; 4) razen injekcijskega sistema, enostavnejša in bolj fleksibilna oprema.

Detektorji so podobni kot pri HPLC analizi. Koložina injiciranega vzorca je med 5 do 200 μL , najbolj tipični so med 10 in 30 μL . Vzorec mora biti injiciran hitro, samo injiciranje pa ne sme zmotiti toka nosilnega pretoka (flow of the carrier stream). Detekcija je največkrat izvedena z atomsko absorbcijo in emisijskimi instrumenti, fluorometri, refraktometri, elektrokemijskimi sistemi in fotometri. Separacije potekajo z dializo, z ekstrakcijo tekoče/tekoče, in plinsko difuzijo. (5)

Kot že omenjeno so bili Nalewajko-Sieliwoniuk s sodelavci prvi, ki so preiskovali zaviralne efekte polifenolov, izoliranih iz *E. acris*, z uporabo kemiluminiscence luminola oksidirane z jodom ter pretočno injekcijsko tehniko (FIA-CL). Določili so antioksidativno aktivnost kofeinske kisline in 6'-kofeilerigozida. Za to tehniko so se odločili zaradi problematike pri ločenem merjenju antioksidativnosti posamezne komponente in pa interakcije med njimi. FIA-CL metoda je bila razvita zato, da določi celotno vsebnost polifenolnih spojin/antioksidativne lastnosti frakcij dietiletra in etilacetata, pridobljenih iz cvetov, listov in korenin *E. acris*-a. Za primerjalno študijo so vzeli prosti radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) in ugotavljali sposobnost odstranjevanja le tega. Prav tako so ocenili antioksidativno aktivnost 6'-kofeilerigozida, ki je bil prvič izoliran iz *E. acris*-a, in jo primerjali z referenčnim antioksidantom – Troloxom.

Da so ocenili točnost razvite CL metode, so določili celotno vsebnost fenolne kisline izražene kot ekvivalent kofeinske kisline z uporabo farmacevtske oblike Immunofort.

2. Eksperimentalni del

2.1 METODE

Za izvajanje eksperimentov so bile uporabljene naslednje tehnike:

1. ^1H , ^{13}C NMR, DEPT, ^1H COSY, HSQC, heteronuklearna večvezna koherenca (HMBC) so bile posnete na Bruker Avance II 400 aparatu.
2. HPLC analiza je bila izvedena z uporabo Vodnega sistema (Milford, MA, USA) opremljenega z Vodno črpalko 600E, 600 Nadzornikom (Controller) in 996 PDA detektorjem (območje merjenja 190nm-400nm). Podatki so bili zbrani in analizirani z Millennium32 Chromatography v4.0 Software. Separacija je bila izvedena z uporabo Simetrične C18 kolone (5 μm ;3,9mm \times 150mm, Waters Corp., USA). Spojine so bile detektirane pri 275nm.
3. Absorpcijski spektri so bili izvedeni na modelu 8452A diod array spektrofotometru (Hewlett-Packard, Nemčija)
4. CL spektri so bili spremljani z uporabo Hitachi F-2500 fluorescenčnim spektrofotometru, z ugasnjenim izvorom svetlobe.

2.2 IZHODNE SPOJINE

Spojine, ki so bile izolirane iz *E. acris*: 6'-kofeilerigozida, luteolin, apigenin, scuterallin.

Dobavljene spojine: kofeinska, ferulična, galska, syringic, vanilinska, protokatetična kislina; Trolox, luminol, DPPH, kloroform, dietil eter, etilacetat, metanol, jod, KI, NaOH.

Štok raztopine fenolnih spojin so bile pripravljene v metanolu in razredčene z vodo, za dosego primernih koncentracij. Metanolne raztopine DPPH[•] so bile pripravljene dnevno pred meritvami. Voda, ki je bila uporabljena za pripravo raztopin, je bila očiščena z Mili-Q Plus vodnim sistemom. Štok raztopina luminola, koncentracije $2,5 \times 10^{-2}$ mol/L, je bila pripravljena v 0,06 mol/L ali 0,15 mol/L NaOH in je bila hranjena v temi pri +4°C. Štok raztopina I₂, koncentracije 5×10^{-2} mol/L, je bila pripravljena v 100ml vode in dodatkom 4g KI.

2.3 PRIPRAVA EKSTRAKTOV

5g listov, socvetja in korenin je bilo ekstrahirano dvakrat, in sicer z 250ml in z 100ml metanola pod refluksom. Po izparevanju topila, je bil preostanek raztopljen v vroči vodi in temeljito ekstrahiran z CHCl_3 , Et_2O , EtOAc . V slednjih dveh je bila višja vsebnost fenolnih spojin, zato so bile uporabljene za nadaljnjo analizo. Po izhlapevanju topila, sta bila preostanka frakcij Et_2O in EtOAc raztopljena v metanolu in razredčena z vodo, da je koncentracija analitov ustrezala rangu linearne kalibracije.

Celotna vsebnost fenolnih spojin je bila analizirana z uporabo rastlinske surovine. Rastlinski pripravek Immunofort v 100g vsebuje : Echinaceae herbae succus (40,0g), Aroniae fructi succus (30,0g), Urticae herbae succus (10,0g) in Bardanae radices succus (10,0g) in je bila standardizirana na fenolne kisline (poznana vsebnost 1.0mg fenolnih kislin izraženih kot ekvivalent kofeinske kisline)

2.4 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA NOVIH SPOJIN IZOLIRANIH IZ E. ACRI RASTLINE

Po metanolni ekstrakciji iz E. acris rastline, je bilo po separaciji na Sephadex LH-20 koloni dobljenih 14 frakcij. Frakcije med 1-10 so bile eluirane z 50% MeOH in frakcije med 11-14 z MeOH. V frakciji 5 je bil prepoznan erigerozid in v frakciji 6 scutelarini. Iz frakcij je bilo pridobljeno 7,395mg spojine **1**. V frakciji 8 je bilo več spojin, ločili so jih na poliamidni koloni z gradientno analizo EtOAc-MeOH . Iz pod-frakcij je bilo pridobljeno 512mg spojine **2**.

^1H NMR spekter spojine **1**, kaže na aromatske protone pri δ_{H} 7.04, 6.99, 6.77 in dva trans olefinska protona pri δ_{H} 6.25 in 7.46, kar nakazuje na prisotnost E-koefeinske molekule. Vendar pa so opaženi tudi singlet pri δ_{H} 8.16 in dubleta pri δ_{H} 8.05 in 6.39, skupaj z γ -pyron ogljikovim signalom pri δ_{H} 172.4, ki izvira iz piromekonske kisline. določitev preostalih ^1H in ^{13}C resonanc sladkorja in signal anomernega protona, pojavlja se pri δ_{H} 4.88, nakazuje da je bil sladkorni preostanek β -D-glukopiranosil. Povezljivost med molekulama glukoze in kofeinske kisline je bila potrjena z HMBC eksperimentom, ki pokaže korelacijski vrh med H-6'a, H-6'b (δ_{H} 4.42 in 4.18) glukoze in resonance karbnilnega ogljika (δ_{C} 166.4 C-9'') kofeinske kisline. Zato je bila spojina **1** identificirana kot piromekonska kislina 6'-kofeilkglukozida, imenovanega tudi 6'-kofeilerigosida.

Spojina **2** je po hidrolizi s kislino, pokazala da gre za kvercentin sestavljen iz aglikona in glukoze. ^1H NMR spekter spojine **2** ustreza podatkom iz literature za spojino kvercentin 3-O-glukozid.

2.5 HPLC ANALIZA EKSTRAKTOV

Mobilna faza A je bila voda, vsebovala je 0,02% trifluoroocetne kisline(TFA), in faza B metanol z 0,02% FTA. Pretok mobilne faze je bil 0,5ml/min. Pogoji gradientne analize so bili naslednji: 0-5min, 25% B; 5-10min, 25-30% B; 10-16min, 30-45% B; 16-18min, 45% B; 18-25min, 45-80% B; 25-30min, 80% B; 30-40min, 80-25% B. Galska, protokatetična, vanilinska, kofeinska, frulična kislina, p-hidroksibenzojska, p-kumarična(coumaric) kislina, prej izolirani flavonoidni aglikoni in 6'-kofeilerigosida so bili uporabljeni kot standardi. Standardi in vzorci so bili raztopljeni v 70% metanolu pri koncentraciji 1mg/ml. Identifikacija komponent je bila narejena z primerjavo retenzijskih časov in UV-vis spektrov. Kromatografski podatki in prisotnost fenolnih spojin v frakcijah Et_2O - in EtOAc -posameznega vira je predstavljena v tabeli 2.

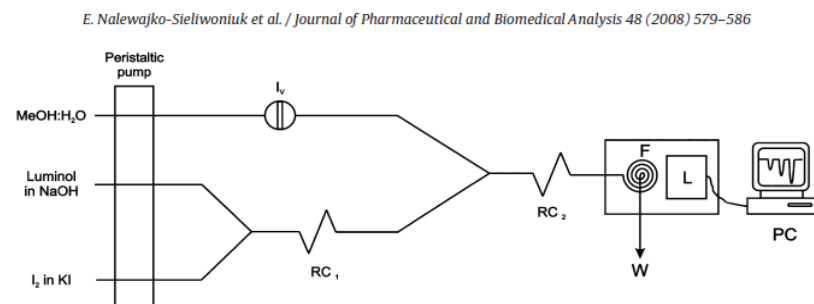
Tabela 2: fenolne spojine dokazane z HPLC v frakcijah Et₂O- in EtOAc-.

Compound	R _t (min)	UV (λ _{max})	Leaves		Inflorescence		Roots	
			Et ₂ O-fraction	EtOAc-fraction	Et ₂ O-fraction	EtOAc-fraction	Et ₂ O-fraction	EtOAc-fraction
Gallic acid	3.31	272	tr	–	–	–	tr	–
Protocatechuic	5.44	260, 295	+	–	++	–	tr	–
Chlorogenic acid	7.51	240, 326	–	–	–	–	–	–
p-Hydroxybenzoic	9.42	256	+	–	+	–	tr	–
Vanillic acid	11.07	260, 292	–	–	+	–	tr	–
Caffeic acid	11.9	323	+	–	+	–	tr	–
p-Coumaric acid	20.42	226, 310	+	–	–	–	tr	–
Ferulic acid	21.74	234, 323	–	–	–	–	tr	–
6-Caffeoylerigeroside	23.08	251, 328	+	+++	–	++	–	+
Quercetin	30.37	256, 370	–	–	++	–	–	–
Luteolin	30.91	254, 351	–	–	+++	–	–	–
Kaempferol	31.84	265, 365	–	–	+	–	–	–
Apigenin	32.06	267, 340	+	–	++	–	–	–

+++ , ++ , + , tr: trace, decreasing content in extracts; R_t: the retention time.

2.6 PROCEDURA IN INSTRUMENTACIJA KEMILUMINISCENCE

Raztopina luminola, I₂ in nosilnega (vodnega) toka (carrier stream) je neprekinjeno poganjala peristaltična črpalka Miniplus 3 (Gilson, Australia) s primernim pretokom do detektorja. Raztopina vzorca je bila injicirana preko zanke volumna 900 μL s pomočjo štirismernega rotacijskega ventila. Nato se je priključila združenemu toku raztopin luminola in I₂ v Perspex T-piece. Za izboljšanje učinkovitosti, sta bili uporabljeni dve mešalni tuljavi (coil) primerne dolžine in širine 0,8mm i.d.. Shema pretočno injekcijskega sistema je prikazana na sliki 2. Detektorski sistem je sestavljala kiveta oz. pretočna celica (flow cell) (ravno navita spiralna PTFE cev 1.0mm i.d., dolžine 25cm in šest navojev), ki je bila postavljena pred fotopomnoževalno cev v posodi odporni na svetlobo. Fotopomnoževalka je bila nastavljena na napetost 1100V.



Slika 2: Shema pretočno injekcijskega sistema z kemiluminiscenčnim detektorjem. RC₁, RC₂: mešalni tuljavi; Iv: injekcijski ventil; L: luminometer; F: flow cell; PC: računalnik; W: odpad.

2.7 ODSTRANJEVANJE DPPH RADIKALA

Sposobnost rastlinskih ekstraktov, da odstranijo prosti radikal DPPH, so določali spektrofotometrično, in sicer po spremenjeni metodi povzeti po Brand-Williams et al.. Raztopine ekstraktov etile tera in dietilacetata so bile pripravljene tako, da so 0.003g suhega ekstrakta raztopili v metanolu. 77 μL tako pripravljene raztopine je bilo dodano metanolni raztopini DPPH* (6×10⁻⁵ mol/L). Vzorci so bili inkubirani v temi pri sobni temperaturi 15min. Izmerjena absorbanca raztopin je bila nižja od absorbance slepega vzorca merjene pri 515nm. Aktivnost odstranjevanja radikala je bila izračunana po naslednji formuli:

$(A_B - A_A)/A_B \times 100$; kjer je A_B absorpcija slepega vzorca (t=0) in A_A absorpcija testirane raztopine ekstrakta (t=15min).

3. Rezultati in diskusija

3.2 ZAVIRALNI EFEKT FENOLNIH SPOJIN NA CL LUMINOLA

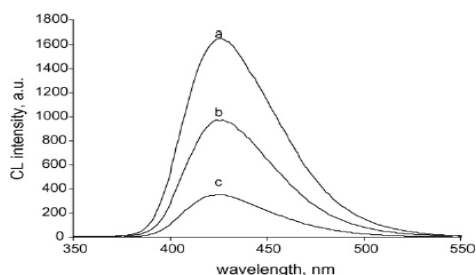
Ugotovljeno je bilo, da so polifenolne in flavonoidne spojine dobri antioksidanti, saj so sposobni odstraniti več ROS, zavirajo verižne reakcije lipidov in so sposobni vezati kovinske ione, ki povzročajo nastanek prostih radikalov. Rastlini *E. acris* lahko pripišemo antioksidativno aktivnost zaradi vsebnosti le teh.

CL metoda za določevanje antioksidativnosti je zelo občutljiva in hitra metoda in dobiva na veljavi in prav tako večji uporabnosti.

Oksidiran luminol povzroča kemiluminiscenco. Reakcija poteka tako, da se najprej tvori radikal luminola (s pomočjo oksidanta) in ta nato pretvori O_2 v O_2^- . Superoksidni radikal nato reagira z radikalom luminola da nastane endoperoksid, ki nato razpade v elektronsko vzbujen 3-aminoftalatni dianion in ta nato emitira svetlobo. Vloga joda pri tej reakciji je, da poveča občutljivost, saj se v njegovi prisotnosti tvori več radikala luminola.

Ko so polifenoli prisotni v raztopini sistema luminol- I_2 se intenzivnost kemiluminiscence močno zmanjša. Sprva so merili CL sistema luminol- I_2 on-line na FIA-CL detektorskem sistemu. Izmerjeno vrednost so uporabili kot basno linijo (I_0). Ob prisotnosti polifenolov se je ta vrednost občutno zmanjšala (I_s). Kvantitativna detekcija je temeljila na intenzivnosti prepuščene kemiluminiscence, izračunali so jo po formuli: $\Delta I = I_0 - I_s$.

Posneli so tudi emisijski spekter reakcijske mešanice luminol- I_2 pri valovni dolžini 425nm. Spektri so si med seboj identični v obeh primerih, ko raztopina vsebuje polifenole (za primer so izbrali kofeinsko kislino) in takrat ko jih ne (slika 3). Razlika je le v intenzivnosti vrhov, ko so prisotni polifenoli je vrh manjši. Iz tega so sklepali, da jod oksidira luminol, da ta tvori vzbujeni 3-APA.



Slika 3. Spektar kemiluminiscence: a) luminol- I_2 ; b) luminol- I_2 -kofeinska kislina(15ng/ml); c) luminol- I_2 -kofeinska kislina(50ng/ml). Luminol: 1.4×10^{-3} mol/L; I_2 : 2×10^{-5} mol/L; NaOH: 6×10^{-2} mol/L

Posneli so tudi UV-vis absorpcijske spektre (slika 4), da bi se prepričali o zaviralnem efektu polifenolov na sistem luminol- I_2 . Posnetih je bilo več spektrov: a) kofeinska kislina, b) I_2 , c) kofeinska kislina + I_2 , d) algebraična vsota spektrov a in b. Iz spektra je razvidno, da se spekter c zelo razlikuje od spektra d, iz česar so sklepali da poteče reakcija med jodom in kofeinsko kislino. V območju 390-500 se pojavi še en vrh, ki so ga pripisali oksidirani obliki kofeinske kisline.

Opazili so tudi, da se ob prepričanju z dušikom intenziteta CL zmanjša za kar 20%. Tako so zaključili, da imajo kisik in ROS veliko vlogo v CL reakciji.

Antioksidativna aktivnost fenolov se kažejo na različne načine. Odstranjujejo ROS in prav tako reagirajo z jodom, to pomeni da se manj joda porabi za oksidacijo luminola. Prisotni so lahko še drugi procesi, kot so: zaviranje nastajanja vzbujenega 3-APA, odstranjevanje katerihkoli radikalov, ki se tvorijo v času reakcije... Toda kateri proces ima prednost oz.

kateri bolj prispeva k antioksidativnosti, ni znano. Znano je, da je vsebnost fenolnih spojin/stopnja antioksidativne aktivnosti proporcionalna negativni višini vrha (ΔI).

3.2 PRETOČNO INJEKCIJSKA KEMILUMINISCENČNA DOLOČITEV

VPLIV KEMIČNIH IN INSTRUMENTALNIH SPREMENLJIVK

Ker so ugotovili da sta kofeinska kislina in 6'-kofeilerigozid močna zaviralca CL efekta, so ju uporabili kot standarda, za določitev celotne vsebnosti polifenolov v vseh delih rastline *E. acris*. Pri določitvah parametrov so upoštevali občutljivost na bazni liniji negativne višine vrha (ΔI) in delež signal-šum (S/N), s tem so dosegli optimalne vrednosti signalov. Prav tako so te dve spojini uporabili za optimizacijo kemičnih in instrumentalnih spremenljivk, in sicer za naslednje koncentracije: $c(\text{kofeinske k.})=0.45\mu\text{g/L}$, $c(6'\text{-kofeilerigozida})=40\mu\text{g/L}$. Preučili so tudi vpliv koncentracije joda in ugotovili da se z višanjem le te povečuje tako signal bazne linije (I_0) kot šum. Maksimalne vrednosti ΔI in S/N so bile dosežene, ko so za kofeinsko k. uporabili $20\mu\text{mol/L}$ joda in za 6'-kofeilerigozid $15\mu\text{mol/L}$ joda. Tudi z višanjem koncentracije luminola sta se zvišala tako ΔI kot intenziteta ozadja CL, maksimum sta dosegla pri koncentraciji $1,4\text{mmol/L}$ luminola za kofeinsko k. in $1,2\text{mmol/L}$ luminola za 6'-kofeilerigozid.

Ker poteka CL reakcija le v bazičnem mediju, so preučili vpliv koncentracije NaOH in ugotovili da so najboljši rezultati doseženi pri vrednostih $6\times 10^{-2}\text{mol/L}$ za kofeinsko k. in $0,1\times 10^{-2}\text{mol/L}$ za 6'-kofeilerigozid.

Štok raztopine fenolnih spojin so bile pripravljene v metanolu in razredčene z vodo. Opazili so, da se je intenzivnost CL spreminjala z koncentracijo metanola in sicer višja je ta bila, manjša je bila intenziteta. Efekt pripisujejo slabši topnosti kisika v metanolu in manjši polarnosti toplia. Zato mora biti koncentracija metanola v nosilnem toku čim manjša.

Preučili so tudi vpliv pretoka nosilnega toka in pa toka reagentov. Pretoki so bili optimalni do $1,7\text{ml/min}$ za kofeinsko k. in $3,6\text{ml/min}$ za 6'-kofeilerigozid.

Optimalen volumen injiciranja je bil pri $400\mu\text{L}$ (kof. k.) in $800\mu\text{L}$ (6'-kofeilerigozid).

Optimalni dolžini tuljav RC_1 in RC_2 sta bili za kof.k. 28cm in 9cm ter za 6'-kofeilerigozid 52cm in 99cm .

ANALITIČNE KARAKTERISTIKE

Višina negativnega vrha je linearno proporcionalna v območju konc. $0,1\text{-}1,5\text{mg/ml}$ za kof.k. in $1\text{-}200\text{ng/ml}$ za 6'-kofeilerigozid. Regresijska enačba za kofeinsko kislino je $\Delta I=(125.2\pm 0,4)C - (13,8 \pm 0,8)$ in za 6'-kofeilerigozid $\Delta I=(0,0456\pm 0,0004)C + (0,448 \pm 0,021)$.

Relativna standardna deviacija (R.S.D.) je za deset meritev znašala $3,3\%$ (kof. k.; $c=0,45\text{ng/ml}$) in $2,9\%$ (6'-kofeilerigozid; $c=40\text{ng/ml}$). Meja zaznavnosti, kot trikratna vrednost S/N, je znašala za kof.k. $4\times 10^{-3}\text{ng/ml}$ in za 6'-kofeilerigozid $0,18\text{ng/ml}$. Predlagana FIA metoda je hitra in omogoča določitev 80-ih vzorcev v eni uri.

Prej opisane optimalne eksperimentalne pogoje so uporabili tudi za določitev drugih fenolnih spojin v frakcijah dietil etra in etil acetata. S tem so približno ocenili celotno vsebnost fenolnih spojin v rastlini *E. acris*.

Koncentracije obeh fenolov so določili tudi z uporabo umeritvene krivulje, kjer so kot standard uporabili reagent Trolox. Podatki so zbrani v tabeli 3. Iz dobljenih rezultatov so ugotovili da je metoda FIA-CL zelo občutljiva, še posebno za kofeinsko kislino. Prvič sploh pa so določili tudi antioksidativno aktivnost 6'-kofeilerigozida, v primerjavi z referenčnimi nakloni Troloxa naj bi imel vsaj polovico antioksidativne aktivnosti le tega.

Tabela 3. Vrednosti analitičnih podatkov fenolnih antioksidantov.

Fraction	Investigated compound	Calibration equation	r	Relative response (%)
Diethyl ether	Caffeic acid	$y = (125.2 \pm 0.4)x + (13.8 \pm 0.8)$	0.9999	100 ^a
	Protocatechic acid	$y = (7.87 \pm 1.67)x + (3.73 \pm 1.52)$	0.9783	6.29 ^a
	Syringic acid	$y = (6.22 \pm 1.11)x + (3.19 \pm 1.01)$	0.9846	4.97 ^a
	Apigenin	$y = (4.70 \pm 0.24)x + (1.17 \pm 1.69)$	0.9962	3.75 ^a
	Vanillic acid	$y = (2.66 \pm 0.13)x + (4.67 \pm 0.12)$	0.9988	2.12 ^a
	p-Hydroxybenzoic acid	$y = (2.20 \pm 0.06)x + (3.03 \pm 0.06)$	0.9996	1.76 ^a
	Luteolin	$y = (1.54 \pm 0.14)x + (2.88 \pm 0.43)$	0.9958	1.23 ^a
	Gallic acid	$y = (1.48 \pm 0.12)x + (1.05 \pm 0.11)$	0.9998	1.18 ^a
	Erigeroside	$y = (1.20 \pm 0.13)x + (3.05 \pm 0.12)$	0.9944	0.96 ^a
	p-Coumaric acid	$y = (0.977 \pm 0.066)x + (5.63 \pm 0.17)$	0.9955	0.78 ^a
	Chlorogenic acid	$y = (0.870 \pm 0.150)x + (6.10 \pm 0.14)$	0.9854	0.69 ^a
	Kaempferol	$y = (0.503 \pm 0.026)x + (1.03 \pm 0.02)$	0.9986	0.40 ^a
	Quercetin	$y = (0.153 \pm 0.006)x + (1.06 \pm 0.02)$	0.9992	0.12 ^a
	Ferulic acid	$y = (0.200 \pm 0.0001)x + (5.64 \pm 0.001)$	0.9999	0.16 ^a
	Trolox	$y = (0.177 \pm 0.013)x + (2.71 \pm 0.001)$	0.9973	0.12 ^a
Ethyl acetate	6'-Caffeoylerigeroside	$y = (0.0456 \pm 0.0004)x + (0.448 \pm 0.021)$	0.9982	100 ^b
	Isoquercitrin	$y = (0.0365 \pm 0.0027)x - (0.021 \pm 0.283)$	0.9955	80.0 ^b
	Scutellarin	$y = (0.0344 \pm 0.0009)x + (0.278 \pm 0.010)$	0.9996	75.4 ^b
	Erigeroside	$y = (0.0040 \pm 0.0001)x + (0.006 \pm 0.06)$	0.9998	8.77 ^b
	Trolox	$y = (0.0765 \pm 0.0011)x + (1.85 \pm 0.06)$	0.9999	165 ^b

^a Relative response to the slope of caffeic acid.

^b Relative response to the slope of 6'-caffeoylerigeroside.

UPORABA METOD

ANALIZA EKSTRAKTOV RASTLINE

Določili so celotno vsebnost fenolov izraženih kot ekvivalent kofeinske k. (frakcije dietil etra) ali 6'-kofeilerigozid (frakcije etilacetata), da bi preverili kako uporabna je metoda. Polifenole so določili iz cevetov, listov in korenin E. acris-a. Metodo pa so preverili tudi z drugačno določljivo antioksidativno aktivnostjo, in sicer spektrofotometrično. Določevali so sposobnost odstranjevanja prostega radikala DPPH. Prišli so do ugotovitve, da se antioksidativnost razlikuje med posameznimi deli rastline. Največjo vsebnost razmerja fenolne spojine/antioksidativna aktivnost je bilo v listih, najmanjša pa v koreninah.

ANALIZA FARMACEVTSKE OBLIKE

Metodo so uporabili tudi za določitev celotne vsebnosti fenolnih spojin (izražene so bile kot ekvivalent kofeinske k.) zeliščnega pripravka Immunofort. Rezultat so podani v tabeli 4. Vrednosti naj bi se dobro ujemale z nominalnimi vrednostmi, toda ker nikjer v literaturi niso bile točno ocenjene te nominalne vrednosti, so test naredili dvakrat. Vsebnost fenolov so določili z uporabo standardnega dodatka, za to so uporabili kofeinsko kislino. Ponovna analiza je potrdila točnost razvite CL metod.

Tabela 4. Vsebnost fenolnih spojin v farmacevtskem preparatu in ponovni test farmacevtskega preparata.

Pharmaceutical preparation	Labeled amount (mg/dose)	Results by proposed method (mg/dose) ^a			Recovery (%) (n=3)
		Found ± S.D.	Added	Total ± S.D.	
Immunofort	1	0.980 ± 0.027	0.33	1.306 ± 0.028	98.4
			0.67	1.662 ± 0.013	101.9

^a Mean of three determinations ± S.D.

4. Zaključek

Nalewajko-Sieliwoniuk s sodelavci so dokazali, da je FIA-CL metoda učinkovita metoda tako za določevanje vsebnosti polifenolov kot za določevanje antioksidativnih lastnosti. Metodo so večkrat preverili, jo optimizirali za uporabo pri različnih metodah. Rezultati dobljeni z metodo so se dobro ujemali z rezultati primerjav (test z DPPH). Metoda je dovolj učinkovita, občutljiva, zanesljiva in preprosta za uporabo, zato ima velik potencial, da postane alternativna metoda za določevanje antioksidativne aktivnosti.

Opomba: seminarska naloga je povzeta po članku 1 (v virih).

5. Viri

1. Edyta Nalewajko-Sieliwoniuk, Jolanta Nazaruk, Ewelina Antypiuk, Anatol Kojło: Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in *Erigeron acris* L. extracts and pharmaceutical formulation by flow injection analysis with inhibited chemiluminescent detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 579–586.
2. . Barni, S.W. Lewis, A. Berti, G. M. Miskelly, G. Lago: Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection, *Talanta* 72 (2007) 896-913
3. <http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Kemiluminiscenca>
4. <http://rastline.mojforum.si/rastline-about766.html>
5. Skoog, Holler, Nieman: Principles of instrumental analysis, fifth edition
6. Gerreke Ph. Biewenga, Guido R. M. M. Haenen in Aalt Bast: The Pharmacology of the Antioksidant Lipoic Acid, *Gen. Pharmac.* Vol. 29, No.3, pp. 315-331, 1997
7. R. Boyer: Temelji biokemije
8. Urška Umek: Sinteza in karakterizacija koordinacijskih spojin z lipojsko kislino in ksanturinsko kislino, Diplomsko delo