



Srednja šola Slovenska Bistrica

SPREMLJANJE KONCENTRACIJE AKTIVNIH KOMPONENT PRI EKSTRAKCIJI KURKUME

Raziskovalna naloga iz kemije

Avtor: Miha Mavsar

Mentorji:

doc. dr. Petra Kotnik

mag. Damijana Gregorič

mag. Marko Žigart

Lektorica: Lidija Ličen

Slovenska Bistrica 2023

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Petri Kotnik za vso pomoč, podporo in podajanje znanja pri izvajanju eksperimentalnega dela in izdelavi zaključnega dela. Zahvaljujem se tudi za dostop do laboratorijev na Medicinski fakulteti v Mariboru in pomoč pri izvajanju kemijskih analiz. Prav tako se zahvaljujem tudi somentorjema mag. Damijani Gregorič in mag. Marku Žigartu za pomoč pri navezovanju stikov z mentorico za splošno vodenje pri pisanju raziskovalne naloge.

Povzetek

V raziskovalni nalogi smo s konvencionalno ekstrakcijsko metodo maceracijo pripravili ekstrakte kurkume z uporabo različnih topil. Izbrali smo topila z različno polarnostjo: metanol, etanol, aceton in heksan. V pripravljenih ekstraktih smo z metodo tekočinske kromatografije z masno spektrometrijo (LC-MS/MS) določili vsebnost aktivnih komponent v odvisnosti od časa ekstrakcije in v odvisnosti od vpliva temperature. Aktivne komponente kurkume kurkumin, demetoksikurkumin in bisdemetoksikurkumina so bile določene tudi z metodo tankoplastne kromatografije (HPTLC). Na koncu smo z metodo DPPH primerjali še antioksidativno dejavnost vzorcev.

Abstract

In this research work, turmeric extracts were prepared using the conventional maceration extraction method with different solvents. We chose solvents with different polarities, including methanol, ethanol, acetone, and hexane. The content of active components in the prepared extracts was determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) as a function of extraction time and temperature. The active components of turmeric - curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin - were also determined by thin-layer chromatography (HPTLC). Finally, we compared the antioxidant activity of the samples using the DPPH method.

KAZALO VSEBINE

1	Uvod	1
1.1	Namen, hipoteze in cilji	1
2	Teoretični del	1
2.1	Kurkuminoidi	1
2.2	Ekstrakcijske tehnike	2
2.2.1	Maceracija	2
2.3	Kemijske analize	3
2.3.1	Tankoplastna kromatografija visoke ločljivosti (HPTLC)	3
2.3.2	Tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo (LC-MS/MS)	4
2.3.3	Antioksidativnostni testi	8
3	Eksperimentalni del	10
3.1	Priprava materiala in ekstrakcija	10
3.2	Določitev vsebnosti aktivnih komponent v ekstraktih z analizo LC-MS/MS	10
3.2.1	Priprava vzorcev na analizo	11
3.2.2	Metoda za določanje vsebnosti kurkumina, demetokstikurkumina, bidemetoksikurkumina	11
3.2.3	Računanje vsebnosti aktivnih komponent v vzorcih	11
3.3	Tankoplastna kromatografija HPTLC	12
3.3.1	Izvedba	12
3.4	Metoda DPPH za določanje antioksidativnosti	13
3.4.1	Opis dela	13
3.4.2	Računanje antioksidativne aktivnosti po metodi DPPH v vzorcih	13
4	Rezultati in razprava	14
4.1	Vsebnost aktivnih komponent v ekstraktih kurkume	14
4.1.1	Primerjava učinkovitosti topil	14
4.1.2	Vpliv temperature	16
4.2	HPTLC-analiza ekstraktov	18
4.3	Antioksidativnost po metodi DPPH	19
5	Zaključek	21
5.1	Potrditev in zavrnitev hipotez	21
6	Literatura	22

1 UVOD

1.1 Namen, hipoteze in cilji

Naš namen je določiti optimalne pogoje pri ekstrakciji. Pogoji, ki jih spremljamo, so topilo, temperatura med ekstrakcijo in čas ekstrakcije. Želimo tudi primerjati antioksidativno aktivnost pri optimalno pridobljenih vzorcih. Ni nujno, da ima vzorec, pridobljen pri optimalnih pogojih, tudi najvišjo antioksidativno aktivnost. V tem primeru se lahko določi drugačne optimalne pogoje.

Hipoteze, ki jih bomo postavili, so naslednje.

Prva hipoteza: Komponente kurkume so glede na polarnost bolje topne v polarnejših topilih.

Druga hipoteza: Čas ekstrakcije je glede na posamezno komponento krajši od 5 minut.

Tretja hipoteza: Pri višji temperaturi se komponente kurkume hitreje ekstrahirajo.

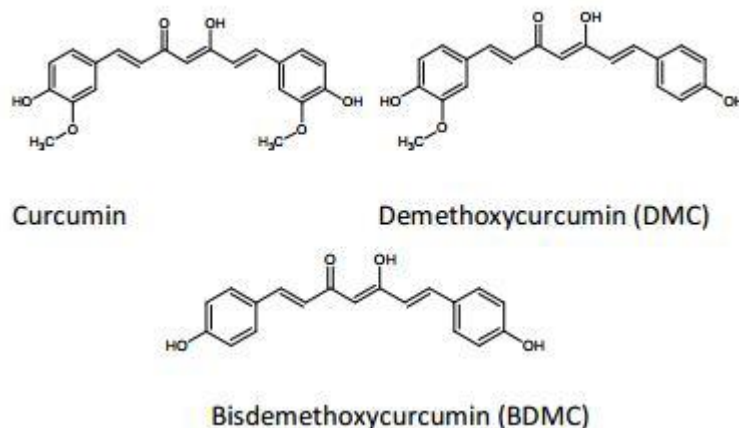
Četrta hipoteza: Ekstrakti kurkume kažejo dobro antioksidativno aktivnost.

Cilji naloge so določitev optimalne temperature, topila in časa ekstrakcije za komponente kurkume z namenom preverjanja antioksidativne aktivnosti pripravljenih vzorce.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 Kurkuminoidi

Posušena korenika *Curcuma longa L.* je znana tudi kot kurkuma in spada v družino Zingiberaceae. Kurkuminoidi so dejavne sestavine posušenega korena *C. longa L.*, ki ga pogosto gojijo v tropskih in subtropskih regijah sveta, zlasti v Aziji in Srednji Ameriki. Kurkuminoidi so sestavljeni iz treh osnovnih sestavin, in sicer iz kurkumina, demetoksikurkumina in bisdemetoksikurkumina, ki spada v skupino fenolnih spojin diferuloilmetan. [1] Kemična struktura kurkuminoidov je prikazana na sliki 1.



Slika 1: Kemijska struktura kurkumina in njegovih analogov [2]

Med različnimi fenolnimi spojinami se kurkuminoidi pogosto uporabljajo kot pigmenti pri predelavi živil, da bi povečali hranilne in senzorične vrednosti živil. Številne študije so se osredotočile tudi na uporabo kurkuminoidov v farmacevtski industriji za zdravljenje številnih bolezni, kot so rak, jetrne bolezni, vnetja, oksidativni stres in sladkorna bolezen. Prav tako imajo in vitro in in vivo antimalarično delovanje. [1]

2.2 Ekstrakcijske tehnike

V zadnjih desetletjih je zanimanje za področje ekstrakcijskih postopkov pripeljalo do novih tehnoloških dosežkov za pridobivanje kurkumina. Na strukturne značilnosti kurkumina in njegove lastnosti lahko bistveno vpliva metoda ekstrakcije. Metode pridobivanja lahko razdelimo na konvencionalne in sodobne. Konvencionalna ekstrakcija, ki temelji na ekstrakcijski moči topil, vključuje Soxhletovo ekstrakcijo, maceracijo in hidrodestilacijo. Soxhletova ekstrakcija je bila prvič zasnovana leta 1879 za ekstrakcijo lipidov, vendar je postala običajna in priljubljena metoda za ekstrakcijo širokega spektra bioaktivnih spojin iz naravnih rastlin z visoko učinkovitostjo (Soxhlet, 1879). Ta metoda se šteje za osnovno ekstrakcijsko tehniko za oceno učinkovitosti drugih konvencionalnih in nekonvencionalnih ekstrakcijskih metod. [2]

2.2.1 Maceracija

Ekstrakcija trdnih vzorcev s topilom, ki je splošno znana kot »trdno-tekoča ekstrakcija« (imenovana tudi »maceracija« ali »namakanje«), je dobro razumljena in pogosto uporabljena metoda. Za ekstrakcijo kurkumina iz rastlin se uporablja širok nabor topil, vključno z nepolarnimi organskimi topili ter s kombinacijo organskih topil in vode. [3]

2.3 Kemijske analize

Za določanje, identifikacijo in kvantifikacijo komponent v naravnih materialih se uporabljajo različne analize metode, med katere spadajo:

- tankoplastna kromatografija visoke ločljivosti (HPTLC),
- tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (LC-MS/MS).

2.3.1 Tankoplastna kromatografija visoke ločljivosti (HPTLC)

Tankoplastna kromatografija (TLC) je poceni, enostavna in hitra metoda, ki se uporablja predvsem za spremljanje kemijskih reakcij, lahko pa jo uporabljamo tudi za identifikacijo in ločevanje komponent nehlapnih zmesi.

Izvaja se na stekleni ali aluminijasti plošči, prevlečeni s tanko plastjo absorbenta, ki služi kot stacionarna faza. Najpogostejši absorbent je silikagel, uporabljajo pa se tudi aluminijev oksid ali celuloza. Molekula silikagela je zgrajena iz skupin Si-OH, ki reagirajo z molekulami preko vodikovih vezi in absorbcije.

Vzorec, ki ga želimo analizirati, se v razredčeni obliki nanese na spodnji del plošče z mikropilaro. Plošča se nato potopi v stekleno komoro s topilom, ki predstavlja mobilno fazo. Če uporabljamo silikagel, ki je zgrajen iz polarnih molekul, moramo uporabiti nepolarno topilo. Topilo potem kapilarno potuje po plošči skupaj z molekulami vzorca. Ločitev komponent v vzorcu je posledica različno močnih interakcij molekul s stacionarno fazo. Polarne molekule močnejše reagirajo s silikagelom (tvorijo vodikove vezi), zato potujejo počasneje kot nepolarne molekule, ki imajo zelo malo ali nič interakcij s silikagelom. Ko topilo doseže potrebno dolžino plošče, da se komponente ločijo, se razvoj v komori prekine in sledi sušenje plošče. Plošča se nato vizualizira neposredno z ultravijolično svetlobo ali se uporabi posebna raztopina, s katero poškopimo ploščo, za preverjanje specifičnih molekul. [4]

HPTLC je najnaprednejša oblika metode TLC, ki zagotavlja visoko stopnjo učinkovitosti in natančnosti. Omogoča računalniško vodeno in avtomatizirano nanašanje vzorcev, razvoj kromatografske plošče v zaprti komori s skrbno nadzorovanimi pogoji in vizualizacijo rezultatov. Metoda se izvaja po standardiziranih metodologijah, ki temeljijo na znanstvenih dejstvih ter potrjenih kvalitativnih in kvantitativnih metodah. [5] Najpogosteje se uporablja za hitro in enostavno določanje kvalitete, pristnosti in čistosti surovih zdravil ali rastlinskih materialov in za identifikacijo aktivnih učinkovin v naravnih materialih. Prednost pred drugimi separacijskimi metodami je predvsem hkratna analiza več različnih vzorcev naenkrat, s čimer skrajšamo čas in zmanjšamo stroške analize, pri tem pa porabimo majhno količino mobilne faze. [10]

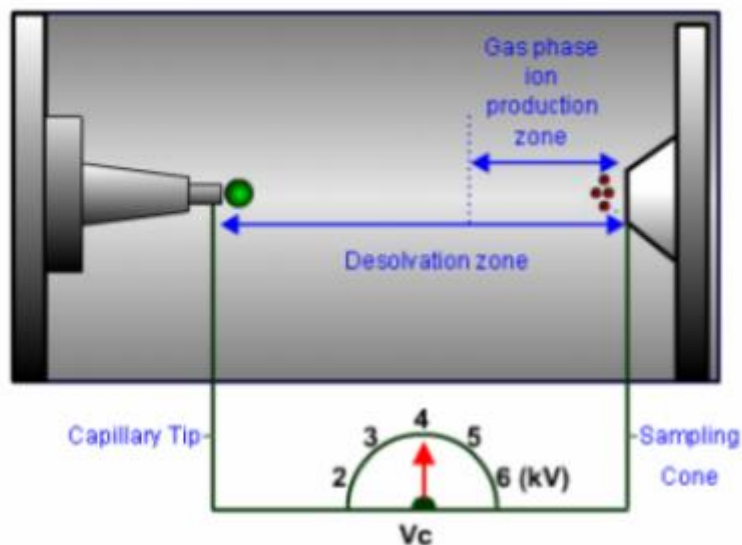
2.3.2 Tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo (LC-MS/MS)

LS-MS/MS je tehnika, ki združuje tekočinsko kromatografijo in masno spektrometrijo. Tekočinska kromatografija (LC) je separacijski proces, ki se uporablja za izolacijo posameznih nehlapnih komponent iz zmesi. Deluje po principu potovanja molekul skozi polarno mobilno fazo in nepolarno stacionarno fazo, ki medsebojno ne smeta reagirati. Mobilna faza potuje skozi kolono, napolnjeno s poroznim medijem iz trdnega zrnatega materiala, prekritega s stacionarno fazo (silikagel, razni polimeri). Vzorec se po injiciranju absorbira na stacionarno fazo v koloni. Spojine se ločijo glede na njihovo težo in afiniteto v mobilni in stacionarni fazi. Molekule, ki imajo najvišjo afiniteto do stacionarne faze, najpočasneje preidejo skozi kolono in obratno.

Učinkovitejša metoda je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti oziroma HPLC, kjer črpalka potiska topilo skozi kolono pod visokim tlakom in s tem premaga padec tlaka v koloni, kar pospeši proces ločevanja. [6]

HPLC lahko poteka po različnih principih, kot so absorpcijska kromatografija, porazdelitvena kromatografija, ionska kromatografija, afinitetna kromatografija in izločitvena kromatografija. Pri HPLC je bistvenega pomena izbira stacionarne in mobilne faze. Ločimo normalno fazo separacije, pri kateri je stacionarna faza polarnejša od mobilne faze, in reverzno fazo separacije (pogostejša), pri kateri je mobilna faza polarnejša od stacionarne faze. Sestavo (polarnost) mobilne faze lahko med separacijo tudi spreminjamo – na ta način imenujemo gradientno izpiranje za razliko od izokratskega, pri katerem ostane polarlost mobilne faze (lahko tudi večkomponentna) v času separacije nespremenjena. Gradientno izpiranje nam omogoča krajše čase zadrževanja močno vezanih komponent na koloni, s čimer zmanjšamo čas same analize. Mobilna faza mora imeti nizko viskoznost, dovolj visoko čistost, da ne vpliva na detektor, in ne sme vplivati na lastnosti kolone. [7]

Masni spektrometer ionizira molekule v vzorcu in jih disociira v ione z manjšo maso, ki so značilni za te molekule. S tem olajša detekcijo in ločitev molekul na podlagi njihove mase in naboja. Vzorec se naprej uplini in potuje v ionizacijsko komoro, v kateri potečeta ionizacija in fragmentacija vzorca. Uporablja se več različnih ionizacijskih tehnik, ki se razlikujejo glede na stopnjo disociacije molekul in energijo (elektronska ionizacija, kemijska ionizacija). [7] Elektronska ionizacija (ESI, angl. *Electrospray ionization*) deluje tako, da prši raztopino vzorca skozi kapilarno, kot vidimo na sliki 2. Na konici kapilare se zaradi visokega potenciala (okoli 4kV) pri atmosferskem tlaku ustvarijo majhne nabite kapljice, ki potem v protitoku s sušilnim plinom (dušik) potujejo proti vhodu v masni analizator in tvorijo plinske ione, ki so pozitivno ali negativno nabiti. [8]



Slika 2: Shema elektronske ionizacije [8]

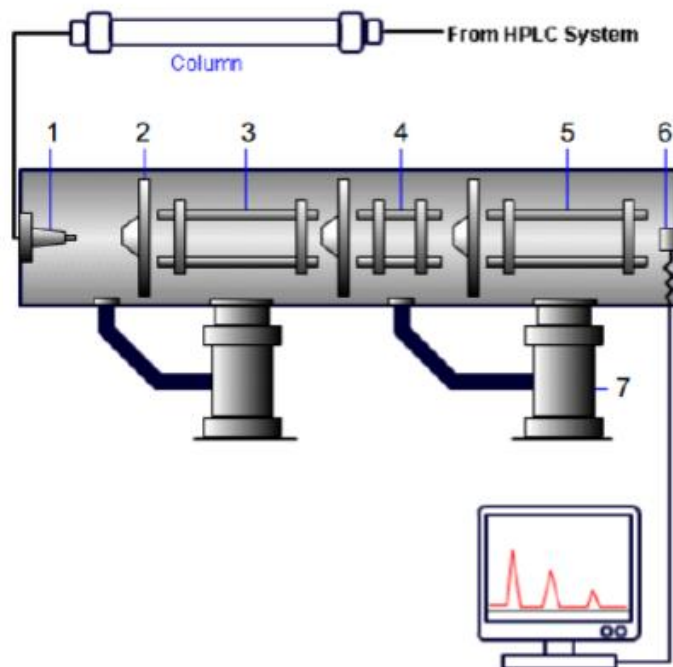
Ioni se ločijo na podlagi razmerja med njihovo maso in nabojem (m/z) v masnem analizatorju ali kvadropolu. Kvadropoli delujejo pri določenem električnem naboju in s spremenljivo napetostjo, zato proizvedejo določeno električno polje, ki dovoli prehod le ionom z določeno vrednostjo m/z , ostali so izločeni. Najpogosteje se uporablja trojni kvadropol, pri katerem s prvim masnim analizatorjem (slika 3, št. 3) izberemo prekursorske ione, ki so značilni za izbrani vzorec. Ioni v kolizijski celici (slika 3, št. 4) razpadejo (fragmentirajo) na produktne ione, ki jih potem loči naslednji masni analizator (slika 3, št. 5). Končni spekter MS/MS zajema samo produkte ioniziranega prekursorja. [7, 8, 9]

Na koncu ioni potujejo še skozi detektor, ki določi vrsto in količino vsakega iona, kar vidimo v masnem spektru kot vrhove na diagramu. [7]

Masni spektrometer je prikazan na sliki 3 in vsebuje:

- 1 – ionski izvor, na katerem se uplinjeni vzorec, ki se je izločil iz kolone, ionizira;
- 2 – stožec z zelo majhno odprtino za vzorec, ki zmanjša vtok plina v masni analizator;
- 3, 5 – masni analizator (kvadropol), ki z električnim poljem povzroči ločitev ionov;
- 4 – kolizijsko celico, pri kateri se ioni, ki pridejo iz masnega analizatorja, fragmentirajo;
- 6 – detektor, ki identificira in kvantificira ione, ki pridejo iz masnega spektrometra, ter pretvori podatke v signal, ki ga potem pošlje v računalnik;

7 – vakuumski sistem. [8]



Slika 3: Masni spektrometer (trojni kvadropol) [8]

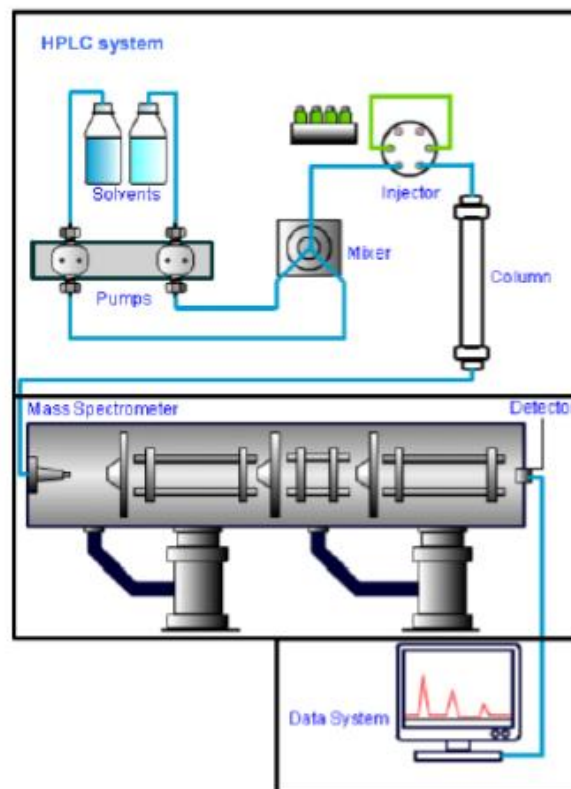
Tehnika LC-MS/MS združuje obe zgoraj navedeni metodi, s čimer poveča natančnost in točnost rezultatov analize. LC-MS/MS ločuje zmesi v skladu z njihovimi fizikalnimi in kemijskimi lastnostmi, nato jih identificira in kvantificira na podlagi njihovega masnega spektra.

Hitrosti pretoka, uporabljene v LC-MS/MS, morajo biti manjše od tistih, ki se uporabljajo za HPLC. S tem naj bi zagotovili popolno ionizacijo in ohranili občutljivost zaznavanja MS, ki se začne zmanjševati z večjim pretokom. Zato je kolona v LC-MS/MS veliko manjša za sprejem manjših pretokov topila in volumskih vzorcev. [6]

Naprava za LC-MS/MS, ki je shematsko prikazana na sliki 4, je sestavljena iz:

- rezervoarja za mobilno fazo;
- črpalke, ki mora zagotoviti visoke tlake in čim bolj konstanten pretok brez pulziranja (najpogosteje se uporablja brizgalna črpalka);
- mešalnika;
- injektorja (najboljši način injiciranja v pretoku mobilne faze predstavlja vrtljivi injektor z zanko s stalnim volumnom oziroma *loop injector*);
- kolone, ki je glavni del naprave HPLC (običajno iz nerjavnega jekla);

- vmesnika, ki je zelo pomemben del naprave, saj predstavlja prenos analita iz naprave HPLC v napravo MS brez vpliva toplila;
- masnega spektrometra (trojni kvadropol);
- detektorja, ki se nahaja na koncu masnega spektrometra, in
- računalnika za kontrolo procesa, obdelavo podatkov in izris kromatogramov. [7]



Slika 4: Shematski prikaz LC-MS/MS [8]

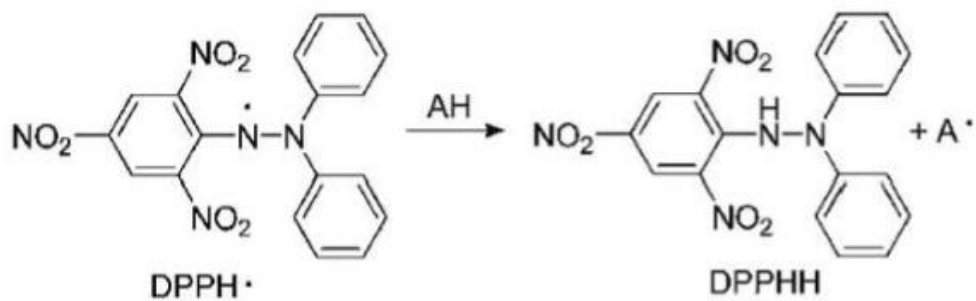
2.3.3 Antioksidativnostni testi

Antioksidanti se v našem telesu borijo proti prostim radikalom, ki nastanejo kot stranski produkt celičnega dihanja ter zaradi onesnaženega zraka, cigaretnega dima, stresa, UV-sevanja, pesticidov, nezdrave prehrane, pomanjkanja gibanja, pomanjkanja spanja in drugih dejavnikov. Prosti radikali nastanejo med procesi oksidacije in redukcije in so v telesu nujno potrebni, vendar njihova prevelika količina uničuje naše celice s tem, da molekulam v telesu odvzamejo elektrone, ker se želijo stabilizirati. Molekula tako postane nestabilna in razpade v nove radikale, kar vodi v verižno reakcijo razpada molekul in nastajanja novih prostih radikalov, na katere se lahko vežejo druge molekule, ki se jim s tem spremeni njihova funkcija (nukleinske kisline, proteini, lipidi). Posledica teh reakcij so lahko poškodbe membrane in navsezadnje apoptoza celic. Ker je v telesu največ kisikovih radikalov in reaktivnih molekul s kisikom, se proces imenuje oksidativni stres. Antioksidant deluje tako, da se hitro veže na proste radikale (odda jim elektron), jih nevtralizira in tako prepreči oksidacijo drugih molekul. Pozitivna lastnost antioksidantov je, da se po reakciji s prostimi radikali spremenijo v stabilnejše spojine in izločijo iz telesa ali se celo obnovijo in ponovno delujejo proti prostim radikalom.

Za določanje antioksidativnosti obstaja več različnih metod. Med njimi se najpogosteje uporabljata metoda DPPH in β -karotenska metoda.

DPPH je stabilen prosti radikal, ki ga stabilizira delokalizacija prostega elektrona na aromatičnem obroču. Lahko ujame druge radikale in se pri tem ne zmanjša. Raztopina radikala DPPH v etanolu tvori močno vijolično barvo v raztopini etanola pri valovni dolžini 515 nm, ki se ob reakciji z donorjem vodika ali elektrona (antioksidantom) spremeni v brezbarvno do blede rumeno barvo. Močna absorbanca radikala DPPH se linearno zmanjšuje s koncentracijo antioksidanta. Je hitra, enostavna in poceni uporabljena metoda za določanje antioksidativne aktivnosti posameznih spojin in njihovih zmesi. Reakcija poteka po principu na sliki 5. [10]

DPPH^{\bullet} (vijolične barve pri 515 nm) + AH \rightarrow DPPH (bledo rumene barve) + A $^{\bullet}$ + H



Slika 5: Reakcija radikala DPPH z antioksidantom (donorjem vodika) [10]

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Priprava materiala in ekstrakcija

Uporabili smo metodo maceracije. V štiri erlenmajerice smo natehtali 500 mg kurkume. V prvo erlenmajerico smo nalili 80 mL etanola, v drugo 80 mL metanola, v tretjo 80 mL acetona in v četrto 80 mL heksana. Erlenmajerice smo zaprli s parafilmom, da bi preprečili izhlapevanje topil. Z magnetnim mešalnikom smo ekstrahirali štiri ure. Vzorčili smo po 300 μ L z avtomatsko pipeto in nastavki ob časih: 1 minuta, 2 minuti, 3 minute, 4 minute, 5 minut, 10 minut, 15 minut, 30 minut, 60 minut, 120 minut in 240 minut. Vzorce smo pipetirali v mikrocentrifugirke oziroma epice. Meritve smo izvedli pri sobni temperaturi ter jih ponovili pri 40 in 60 °C.



Slika 6: Vzorčenje z avtomatsko pipeto

3.2 Določitev vsebnosti aktivnih komponent v ekstraktih z analizo LC-MS/MS

Z analizo LC-MS/MS smo določili vsebnost kurkumina, demetoksikurkumina in bisdemetoksikurkumina v raztopinah ekstraktov. Analize smo izvajali z LC-MS/MS-kromatografom Agilent 1200 HPLC, ki je povezan s trojnim kvadropolom 6460 JetStream.

Kromatograf je prikazan na sliki 7. Za obdelavo podatkov smo uporabljali računalniško opremo Agilent MassHunter.



Slika 7: Kromatograf LC-MS/MS [4]

3.2.1 Priprava vzorcev na analizo

Pripravili smo raztopine ekstraktov v etanolu, metanolu, acetonu in heksanu.

3.2.2 Metoda za določanje vsebnosti kurkumina, demetoksikurkumina, bidemetoksikurkumina

Najprej smo pripravili raztopino standarda s koncentracijo 4 mg/mL v metanolu in jo razredčili do koncentracije 4 µg/mL ter z njo razvili metodo za določevanje kurkuminoidov.

3.2.3 Računanje vsebnosti aktivnih komponent v vzorcih

Rezultat analize LC-MS/MS je kromatogram z vrhovi z različnimi retencijskimi časi. Iz površin teh vrhov nam program izračuna koncentracijo posamezne dejavne komponente v vzorcu. Vsebnost kurkumina, demetoksikurkumina in bidemetoksikurkumina v ekstraktu smo določili po naslednji enačbi:

$$\text{vsebnost v ekstraktu (\%)} = \frac{\gamma_c}{\gamma_0} * 100$$

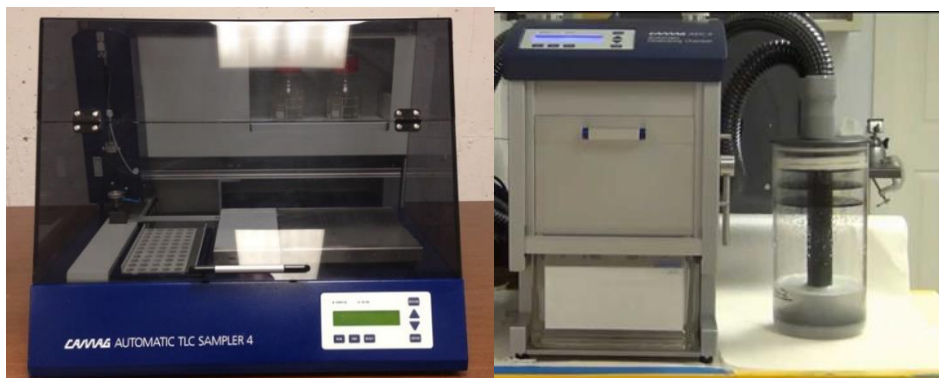
pri čemer sta:

γ_c koncentracija aktivne komponente v vzorcu [mg/mL]

γ_0 koncentracija ekstrakta v raztopini [mg/mL]

3.3 Tankoplastna kromatografija HPTLC

Kurkumine, izolirane iz biološkega materiala, smo ločevali s HPTLC. Pri tem smo uporabljali avtomatski nanašalec vzorca CAMAG ATS-4 (slika 8), razvijalno komoro CAMAG ADC2 (slika 8), komoro za slikanje rezultata CAMAG Visualizer in UV-čitalec CAMAG (slika 9).



Slika 8: Nanašalec vzorca (levo) in razvijalna komora (desno)



Slika 9: Vizualizator CAMAG (levo) in UV-čitalec CAMAG (desno)

Vse instrumente smo upravljali s priloženo programsko opremo WinCats 1.4.8.

3.3.1 Izvedba

Za nosilce smo uporabili steklene plošče HPTLC velikosti 10 x 10 cm s stacionarno fazo silikagela 60 F254 proizvajalca Merck. Ploščo smo predhodno aktivirali z metanolom v pečici pri 115 °C za 10 minut. Na HPTLC-ploščo smo nanašali od 1 do 6 vzorcev volumna 20 μ L z razmikom po 1,5 cm. Nanosi so bili od spodnjega roba plošče oddaljeni 0,8 cm, od stranskega roba pa 1 cm. V razvijalni komori je bila relativna vlažnost med poskusi 30-odstotna. Relativno vlažnost zraka smo uravnavali z nasičenimi raztopinami soli, ki nad njihovo nasičeno raztopino

vzdržujejo določeno relativno vlažnost. Uporabljali smo raztopino magnezijevega klorida (rH = 33 %). Kot mobilno fazo za razvijanje kromatograma smo uporabljali topilo: toluene in očetno kislino v razmerju 4 : 1 (v/v). Za nasičenje razvijalne komore smo uporabili 10 mL izbrane mobilne faze, proces je trajal 20 minut. Po nasičenju smo ploščo potopili v 10 mL iste mobilne faze in razvijanje plošče prekinili, ko je fronta topila dosegla razdaljo 8,5 cm od spodnjega roba plošče. Med celotnim procesom je bila temperatura znotraj razvijalne komore 23 °C. Ploščo smo sušili na sobni temperaturi približno 5 minut. Po sušenju smo rezultate posneli s kamero pri valovni dolžini 254 nm, 366 nm in pri beli svetlobi.

3.4 Metoda DPPH za določanje antioksidativnosti

Z metodo DPPH smo določili antioksidativnost raztopin ekstraktov v etanolu, metanolu, acetonu in heksanu.

3.4.1 Opis dela

Najprej smo pripravili raztopino DPPH, tako da smo 1,98 mg DPPH raztopili v 50 mL metanola. Za slepi vzorec smo uporabili samo metanol.

Vzorci smo redčili v razmerju 1 : 5, jih po 10 µL odpipetirali na titrsko ploščo in dodali 200 µL DPPH reagenta. V tri vodnjake smo odpipetirali samo metanol. Nato smo izmerili absorbanco pri 517 nm.

3.4.2 Računanje antioksidativne aktivnosti po metodi DPPH v vzorcih

Antioksidativnost smo izračunali po enačbi

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} * 100$$

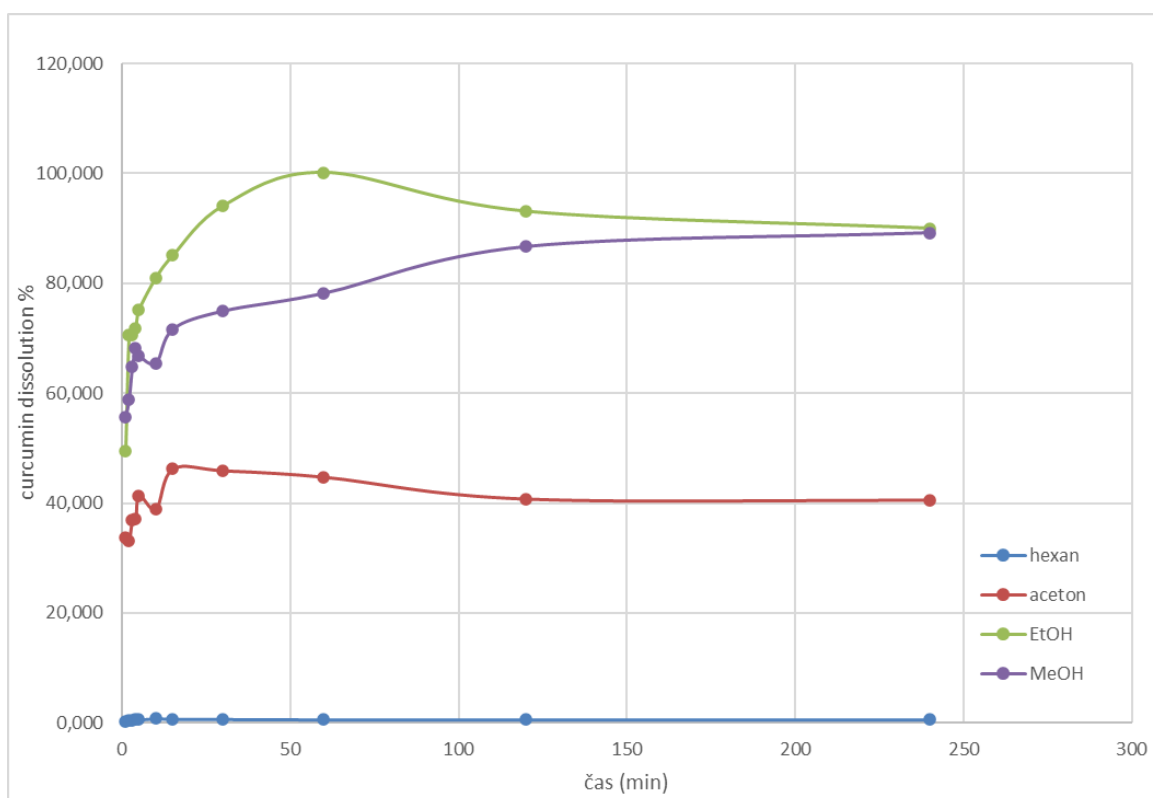
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Vsebnost aktivnih komponent v ekstraktih kurkume

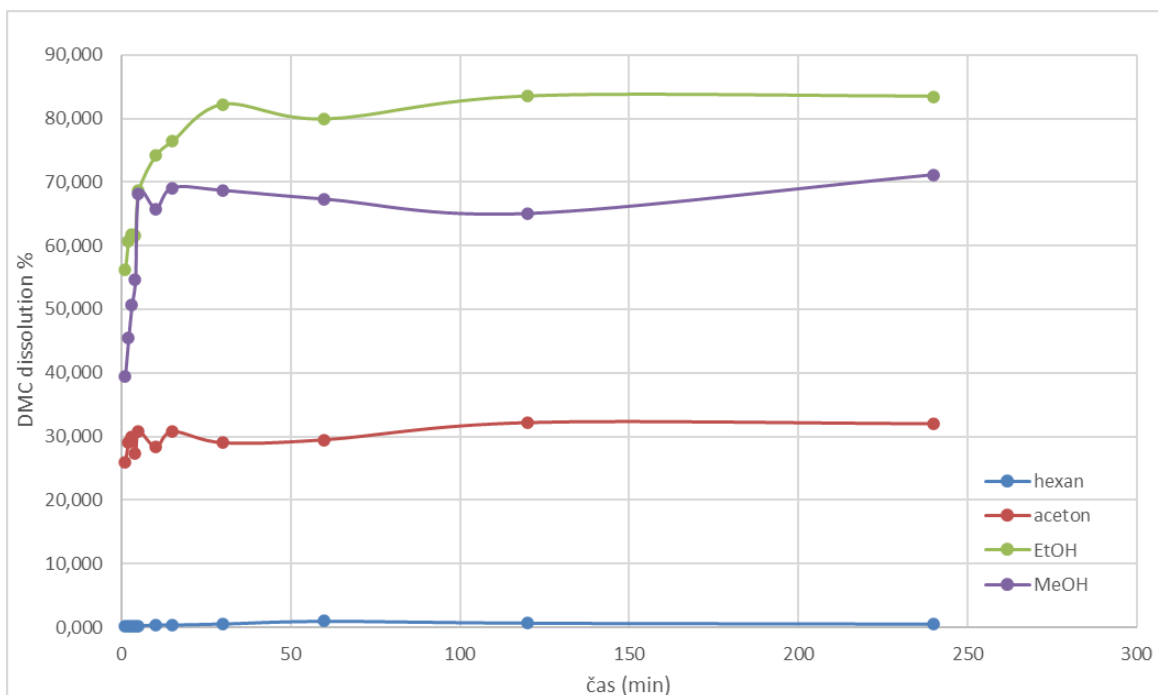
Z LC-MS/MS smo določili koncentracijo kurkumina, demetoksikurkumina in bisdemetoksikurkumina v ekstraktih kurkume ob določenih časih. S temi koncentracijami smo lahko s programom Excel narisali grafe vsebnosti aktivnih komponent v odvisnosti od časa.

4.1.1 Primerjava učinkovitosti topil

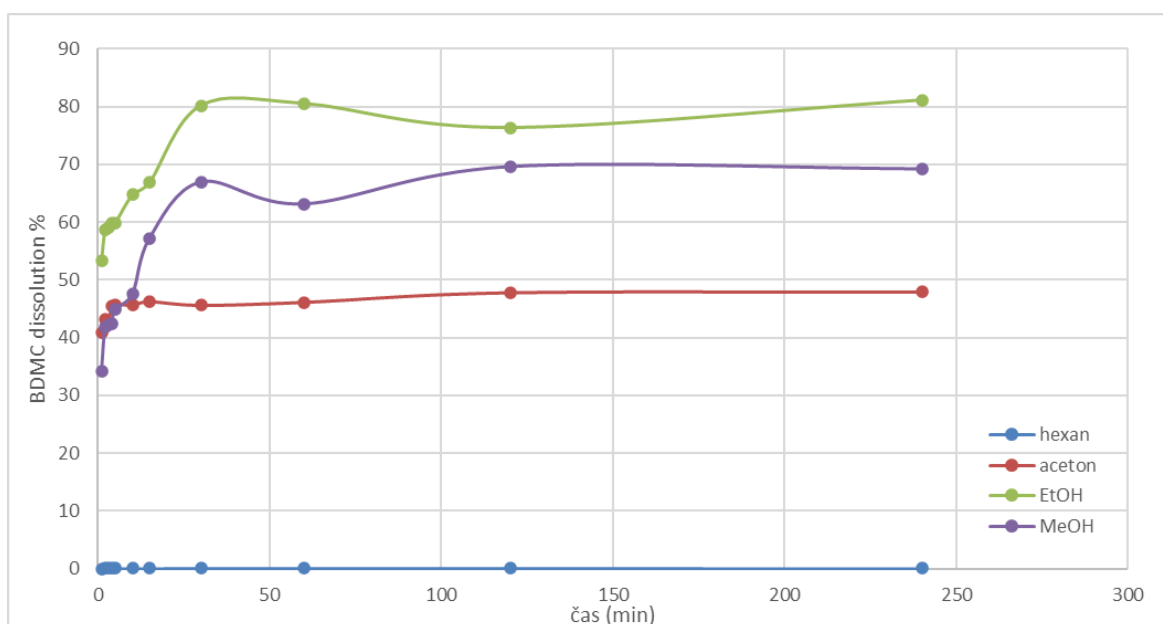
Iz grafov 1, 2 in 3 lahko razberemo, da je najučinkovitejše topilo etanol, saj je koncentracija kurkumina dosegla 100 odstotkov, demetoksikurkumina 84 odstotkov in bisdemetoksikurkumina 81 odstotkov. Nekoliko manj učinkovito topilo je metanol, še manj aceton. Vidimo, da je heksan najslabše topilo za ekstrahiranje kurkume, saj smo dobili skoraj zanemarljive vrednosti koncentracij v primerjavi z ostalimi topili.



Graf 1: Koncentracija kurkumina v odvisnosti od časa pri sobni temperaturi



Graf 2: Koncentracija demetoksikurkumina v odvisnosti od časa pri sobni temperaturi

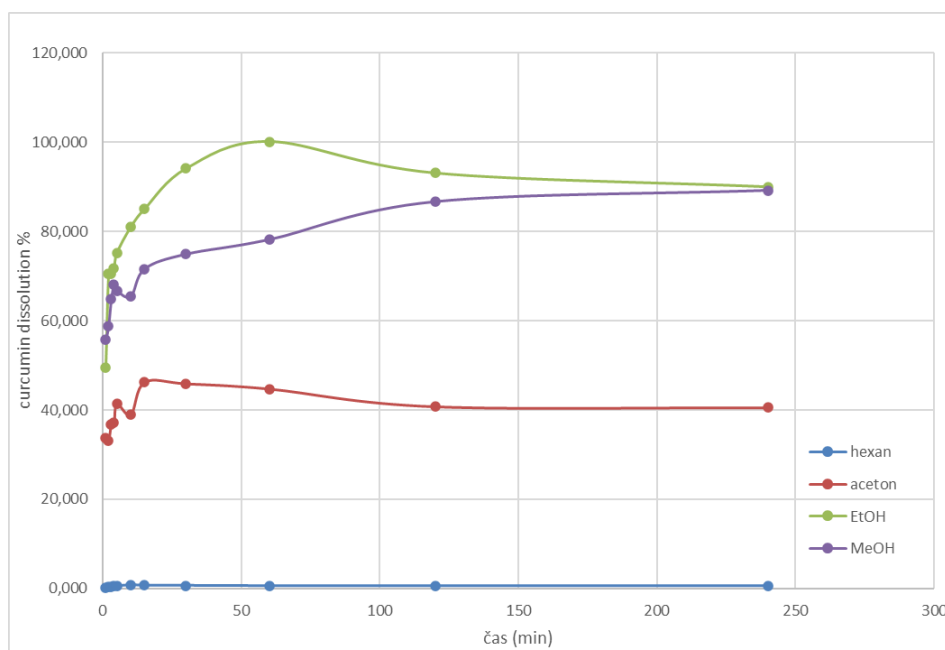


Graf 3: Koncentracija bisdemetoksikurkumina v odvisnosti od časa pri sobni temperaturi

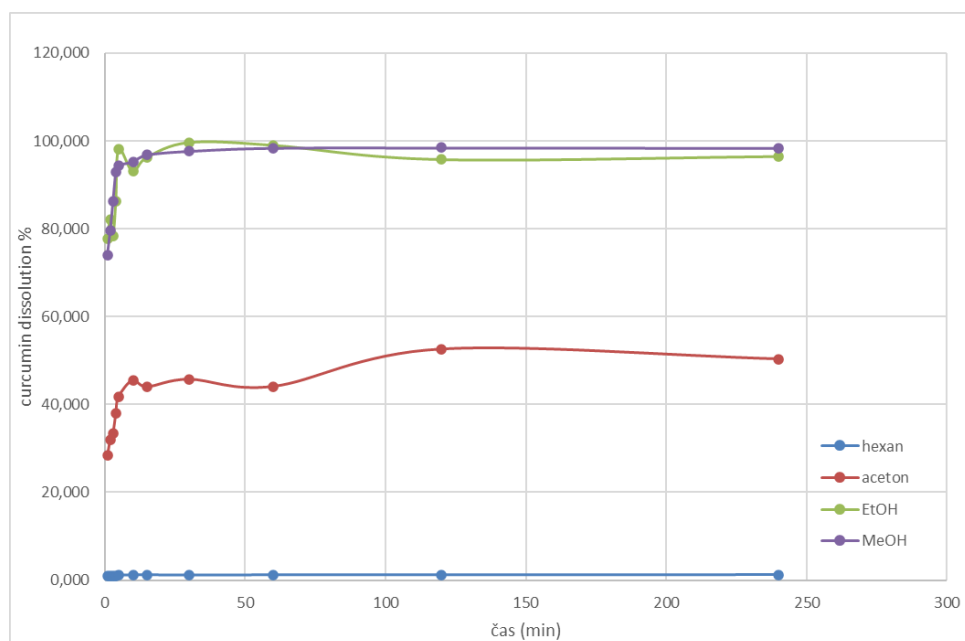
Iz grafov 1, 2 in 3 lahko odčitamo tudi rahla nihanja, kar je lahko posledica merskih napak. Ker smo imeli tudi nekaj težav z uravnavanjem temperature, je mogoče tudi to eden izmed razlogov za nepričakovana nihanja v grafih. Padec koncentracije komponent lahko nakazuje tudi na razgradnjo teh komponent.

4.1.2 Vpliv temperature

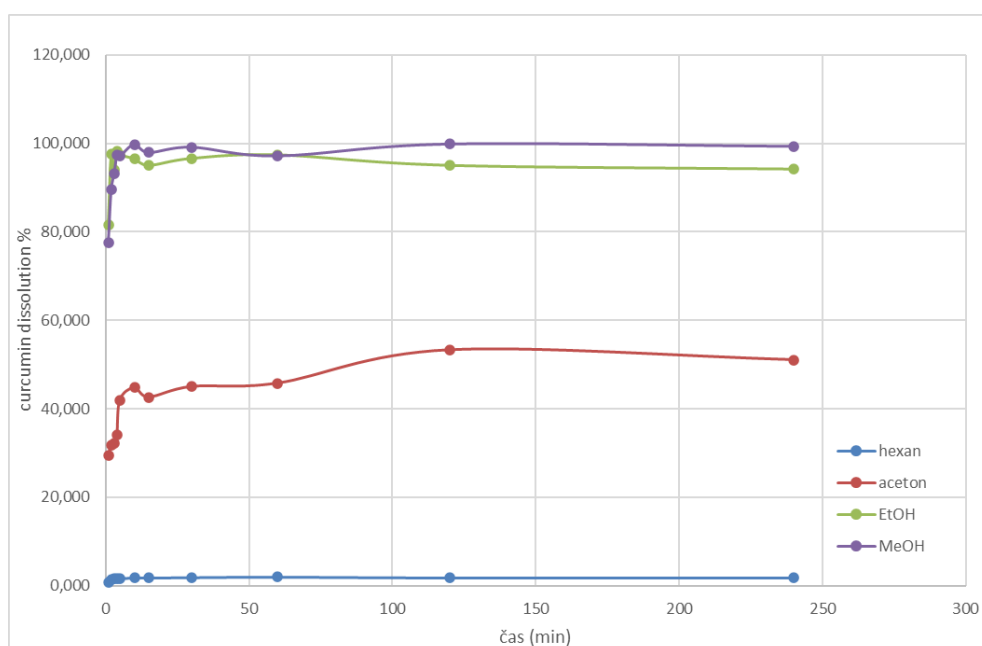
Iz grafov 4, 5 in 6 lahko vidimo primerjavo vpliva temperature na ekstrakcijo kurkumina v različnih topilih pri sobni temperaturi, pri 40 °C in 60 °C. Vidimo, da so vrhovi krivulj pri vseh treh grafih na približno isti koncentraciji. Kurkumin v etanolu pri vseh treh temperaturah doseže najvišjo koncentracijo, in sicer okoli 98-odstotno. Opazimo, da graf opazno hitreje doseže najvišjo koncentracijo pri višjih temperaturah. Pri ekstrakciji kurkumina v etanolu pri sobni temperaturi smo potrebovali 60 minut, pri 40 °C 5 minut in pri 60 °C le dobri 2 minuti.



Graf 4: Koncentracija kurkumina v odvisnosti od časa pri sobni temperaturi



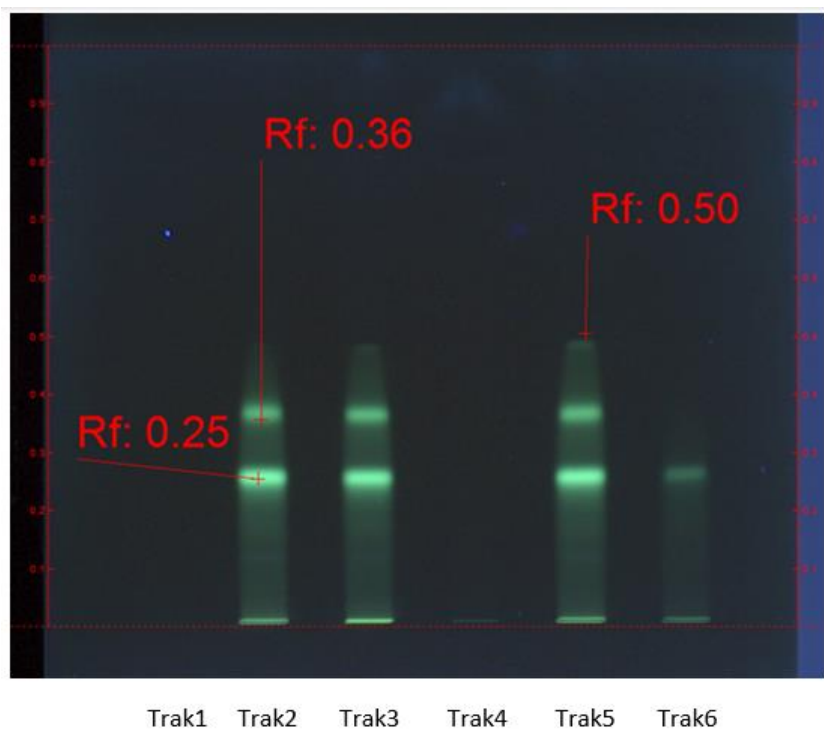
Graf 5: Koncentracija kurkumina v odvisnosti od časa pri 40 °C



Graf 6: Koncentracija kurkumina v odvisnosti od časa pri 60 °C

4.2 HPTLC-analiza ekstraktov

Na sliki 10 lahko vidimo uspešno ločitev komponent na HPTLC-kromatografski plošči.



Slika 10: Kromatogram pri UV 366 nm z retenzijskimi faktorji iskanih komponent: BDMC Rf = 0,25, DCM Rf = 0,36 in curcumin Rf = 0,50

Trak 1: kurkuma v metanolu (redčitev 1 : 1000)

Trak 2: kurkuma v metanolu

Trak 3: kurkuma v acetonu

Trak 4: kurkuma v heksanu

Trak 5: kurkuma v etanolu

Trak 6: kurkuma v metanolu (redčitev 1 : 1000)

Kurcumin je s topilom potoval hitreje in dosegel retenzijski faktor 0,50. Demetoksikurcumin ima retenzijski faktor 0,36, kar pomeni, da je s topilom potoval nekoliko počasneje kot kurcumin. Najnižji retenzijski faktor ima bisdemetoksikurcumin, in sicer znaša 0,25.

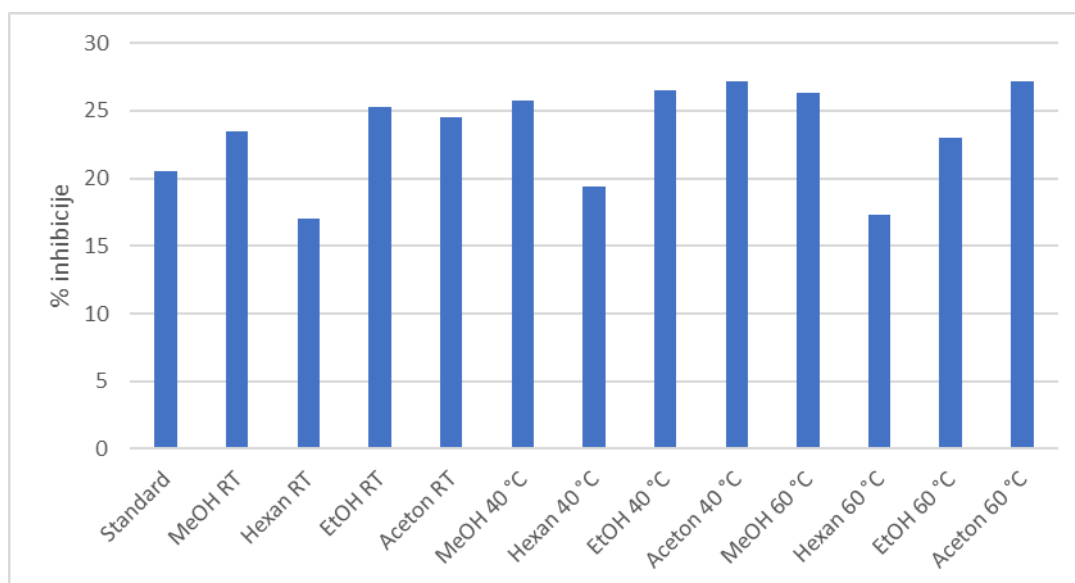
4.3 Antioksidativnost po metodi DPPH

Z metodo DPPH smo določili antioksidativnost. Z metodo, navedeno pod točko 3.4, smo izračunali naslednje vrednosti.

Preglednica 1: Odstotek inhibicije v vzorcih

Vzorec	% inhibicije
Standard	20,50
MeOH RT	23,51
Hexan RT	17,04
EtOH RT	25,23
Aceton RT	24,52
MeOH 40 °C	25,72
Hexan 40 °C	19,34
EtOH 40 °C	26,52
Aceton 40 °C	27,14
MeOH 60 °C	26,29
Hexan 60 °C	17,26
EtOH 60 °C	22,97
Aceton 60 °C	27,18

Za lažje primerjanje in boljšo preglednost smo pripravili graf 7.



Graf 7: Primerjava odstotkov inhibicij

Višji kot je odstotni delež, večja je inhibicija in večja je antioksidativna aktivnost vzorca. Iz grafa 7 in preglednice 1 lahko razberemo, da ima največjo inhibicijo pri sobni temperaturi ekstrakt, pripravljen v etanolu pri sobni temperaturi, v katerem je razmerje kurkumin : DMC : BDMC = 3 : 1 : 1. Pri 40 °C in 60 °C ima največjo inhibicijo acetonekstrakt, pripravljen v acetonu, v katerem je razmerje kurkumin : DMC : BDMC = 4,5 : 1 : 2. To pomeni, da razmerje aktivnih komponent vpliva na antioksidativno aktivnost ekstrakta in je odvisno od topila, ki smo ga uporabili.

5 ZAKLJUČEK

Ekstrakte iz mlete kurkume smo pridobili s konvencionalno metodo maceracije. Ekstrakte smo pripravili v metanolu, etanolu, acetonu in heksanu.

V raziskovalni nalogi smo v ekstraktih določali vsebnost aktivnih komponent, ki jih najdemo v kurkumi, in sicer kurkumina, demetoksikurkumina in bisdemetoksikurkumina LC-MS/MS. Komponente smo tudi ločevali s HPTLC. Na koncu smo z metodo DPPH primerjali antioksidativno aktivnost vzorcev.

V prihodnje bi lahko raziskovalno delo nadgradili, da bi uporabili še druge oblike ekstrakcijskih metod. Na primer konvencionalno Soxhletovo ekstrakcijo, ultrazvočno ekstrakcijo ali katero od nekonvencionalnih metod, kot sta ekstrakcija z mikrovalovi ali ekstrakcija s superkritičnimi fluidi.

5.1 Potrditev in zavrnitev hipotez

Prvo hipotezo, ki se glasi, da so komponente kurkume glede na polarnost bolje topne v polarnejših topilih, lahko potrdimo, saj smo dobili največjo vrednost ekstrahiranih aktivnih komponent kurkume prav v polarnih topilih, kot sta etanol (% kurkumina pri sobni temperaturi = 100 %) in metanol (% kurkumina pri sobni temperaturi = 89 %), nekoliko manj v acetonu (% kurkumina pri sobni temperaturi = 46 %) in skoraj nič v heksanu (% kurkumina pri sobni temperaturi = 0,8 %).

Drugo hipotezo, ki se glasi, da je čas ekstrakcije glede na posamezno komponento krajši od 5 minut, lahko potrdimo, ampak le pri višji temperaturi, saj je čas ekstrakcije posameznih komponent pri sobni temperaturi znašal več kot 5 minut: pri ekstrakciji kurkumina v etanolu smo pri sobni temperaturi potrebovali približno 60 minut, da smo dosegli najvišjo koncentracijo; pri 40 °C smo potrebovali 5 minut in pri 60 °C le dobri 2 minuti. Torej lahko sklepamo, da višja kot je temperatura, hitrejši bo čas ekstrakcije.

Tretjo hipotezo, ki se glasi, da se komponente kurkume pri višji temperaturi hitreje ekstrahirajo, lahko potrdimo, saj lahko to razberemo iz grafov 4, 5 in 6, in sicer iz same strmine oziroma naklona grafa v prvih minutah ekstrakcije.

Četrto hipotezo, ki se glasi, da kažejo ekstrakti kurkume dobro antioksidativno aktivnost, lahko tudi potrdimo, saj lahko iz preglednice 1 razberemo zmeren odstotek inhibicije: ekstrakt v acetonu pri 60 °C kaže največjo absorbanco in torej največjo antioksidativno aktivnost; najmanjšo kaže ekstrakt v heksanu pri sobni temperaturi. Iz tega lahko razberemo, da je najprimernejše topilo za ekstrakcijo, s katerim želimo doseči najvišjo antioksidativno aktivnost, aceton pri 60 °C.

6 LITERATURA

- [1] Sujata S. Patil, Siddhant Bhasarkar & Virendra K. Rathod, Extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*: comparative study between batch extraction and novel three phase partitioning. Marec 2019:
<https://www.tandfonline.com/loi/lpbb20>.
- [2] Foozie Sahne, Maedeh Mohammadi, Ghasem D. Najafpour, Ali Akbar Moghadamnia. Extraction of bioactive compound curcumin from turmeric (*curcuma longa* L.) via different routes: a comparative study. Iran 2016.
- [3] Tian Jiang, Raja Ghosh, Catherine Charcosset. Extraction, purification and applications of curcumin from plant materials-A comprehensive review. 2021
www.elsevier.com/locate/tifs.
- [4] PharmaXChange Thin Layer Chromatography (TLC): Principle (with Animation), 2012, <https://pharmaxchange.sinfo/2012/11/thin-layer-chromatography-tlc-principle-with-animation/>.
- [5] Camag, What is TLC/HPTLC,
https://www.camag.com/en/tlc_hptlc/what_is_tlchptlc.cfm.
- [6] Chemyx, Basic principle of LC, HPLC, MS & MS,
<https://www.chemyx.com/support/knowledge-base/applications/basic-principles-hplc-ms-lc-ms/>.
- [7] Kealey, D., Haines, P. J., Analytical Chemistry. UK: BIOS, 2002.
- [8] Chromacademy, Mass Spectrometry, Fundamental LC – MS, Introduction,
<http://www.ecs.umass.edu/eve/background/methods/chemical/Openlit/Chromacademy%20LCMS%20Intro.pdf>.
- [9] University of Bristol, Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS), Life Sciences Mass Spectrometry Facility,
<http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html>.
- [10] Lesičar, Špela. Magistrsko delo. Antioksidativne lastnosti biološko aktivnih komponent v ekstraktih črne kumine in njihov vpliv na viabilnost celic. Maribor 2020.