

Mladi za napredek Maribora

34. srečanje

Vpliv alfa-tokoferola na stabilnost kurkumina pri pH 8

Področje: Kemija in kemijska tehnologija

Raziskovalna naloga

Avtor: PRIYA KUMAR
Mentor: ZDENKA KEUC
Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, februar 2017

Mladi za napredek Maribora

34. srečanje

Vpliv alfa-tokoferola na stabilnost kurkumina pri pH 8

Področje: Kemija in kemijska tehnologija

Raziskovalna naloga

Maribor, februar 2017

VSEBINA

Povzetek	7
Zahvala	8
1 UVOD	9
1.1 NAMEN RAZISKAVE	9
1.2 HIPOTEZE	10
1. 2.1 Razlaga hipotez	11
1.3 PREDVIDENE METODE DELA	13
2 TEORETIČNI DEL	13
2.1 Zgodovina uporabe kurkume	13
2.1.1 Uporaba kurkume v medicini	14
2.2 Kemijska zgradba kurkumina in njegove lastnosti	15
2.3 Kurkumin- kovinske interakcije	21
3 RAZISKAVA – 1. DEL	22
3.1 IZVEDBA PRAKTIČNEGA DELA	22
3.1.1 Preizkus topnost kurkume v različnih topilih	22
3.1.2 Ekstrakcija s soxhletovim aparatom	23
3.1.3 Destilacija z vodno paro	23
3.2 IZKORISTKI EKSTRAKCIJ	24
3.3 TLC ANALIZA EKSTRAKTOV	24
3.4 VIS IN ATR-FTIR spektrofometrična ANALIZA EKSTRAKTOV	25
4 REZULTATI	26
4.1 PREIZKUS TOPNOSTI KURKUME V RAZLIČNIH TOPILIH	26
4.2 IZKORISTEK EKSTRAKCIJE	28
4.2.1 Ekstrakcija z soxhletovim aparatom	28
4.2.2 Hidro-ekstrakcija s kavnim aparatom	29
4.3 ANALIZA PRIDOBLJENIH EKSTRAKTOV	31
4.3.1 Analiza s tankoplastno kromatografijo (tlc)	31
4.3.2 Analiza uv-vis spektrov (po tlc ločbi)	32
4.2.3 Analiza IR spektrov	33
4.4 Določitev koncentracije kurkumina v ekstraktih	35
5 RAZPRAVA	37

6 RAZISKAVA – 2. DEL – SINTEZA KOMPLEKSOV kurkumina Z ŽELEZOM	39
6.1 IZVEDBA PRAKTIČNEGA DELA.....	40
6.2 Rezultati.....	41
6.2.1 masa kompleksov železa in kurkumina	41
6.2.2 Izračun izkoristka	43
7.3 Spektralne analize produktov.....	44
7.3.1 ATR-FTIR analiza	44
7.3.2 UV- VIS spektroskopija	47
7.4 STABILNOST KELATOV ŽELEZA PRI RAZLIČNIH vrednostih pH.....	47
7.4.1 Obstočnost kompleksov v odvisnosti od valence železa.....	49
7.5 Topnost kompleksov kurkumina z železovimi ioni V VODI.....	49
7.6 Razprava	50
8 zaključki	52
9 družbena odgovornost	53
10 uporabljeni viri	54

Kazalo slik

Slika 1 - Nukleofilna adicija kurkumina s proteini, kjer je X lahko žveplo (S) ali selen (Se) (Priyadarsini, 2014).....	10
Slika 2 - Strukturna formula kurkumina (Palipoch s sod. , 2014)	11
Slika 3 - Hipotetičen primer nastanka kompleksa kurkumina z železom (razmerje 1:2).....	12
Slika 4 - Hipotetičen primer nastanka kompleksa z železom (razmerje 1:1).....	12
Slika 5 - Hipotetičen primer kompleksa železa kurkumina in α -tokoferola	12
Slika 6 - Hipotetičen primer sinteze kompleksa kurkumina v oktaedrični postavitvi (Palipoch s sod. ,2014).....	12
Slika 7 - Regeneracija fenoksilnega radikala kurkumina s C vitaminom (Taylor s sod., 1992)	14
Slika 8 - Struktura štirih najpogostejših kurkuminoidov v kurkumi (Goel s sod., 2008).....	15
Slika 9 - Keto-enolna tautomerija kurkumina.....	16
Slika 10 - Strukturne spremembe kurkumina v različnih topilih (Goel s sod., 2008)	16
Slika 11 - Porazdelitev naboja pri kurkuminu v vodi (Goel s sod., 2008)	17
Slika 12 - Vpliv pH in temperature na razgradnjo kurkumina (Goel s sod., 2008)	18
Slika 13 - Shematski prikaz alkalne razgradnje kurkumina (Wang s sod., 1997).....	19

Slika 14 - Razgradnja kurkumina pod vplivom sončne svetlobe (Tønnesen s sod. 1986)	19
Slika 15 - Nekateri sintetični kurkumini (Robinson s sod., 2005)	20
Slika 16 - Fotokemijska in kemijska nestabilnost kurkumina	21
Slika 17 - Možne strukture kompleksa kurkumina in železa v vodni raztopini	21
Slika 18 - Kafetiera uporabljena v nalogi	24
Slika 19 - Strukturna formula kurkumina v njegovi diketo in keto-enolni obliki z označenimi funkcionalnimi skupinami (Yuan s sod., 2012)	26
Slika 20 - Slaba topnost kurkume v vodi v vodi (delci kurkume lebdijo v raztopini in se počasi usedajo).	26
Slika 21 - Uporaba različnih topil za ekstrakcijo kurkumina iz kurkume 28	
Slika 22 - Ekstrakcija kurkumina z etanolom v Soxhletovi aparaturi ter ostranitev topila z rotavaporjem	29
Slika 23 - Modificirana parna ekstrakcija s kavnim avtomatom	29
Slika 24 - Ločitev oljne faze od vodne faze z lijem ločnikom (levo) ter vizualna primerjava vse pridobljenih ekstraktov (pred popolno odstranitvijo topila).	30
Slika 25 - Tankoplastna kromatografija ekstraktov (levo) in razviti kromatogrami (desno).	31
Slika 26 - Primer kompleksa čistega kurkumina z Fe(II) in α -tokoferolom po filtraciji (levo) in kristali kurkumina z Fe(II) desno	42
Slika 27- Kompleksi železa po odstranitvi topila z železovimi ioni	42
Slika 28 - Primerjava spektra čistega kurkumina (rdeča krivulja) in kurkumina z Fe(II) ioni (črna krivulja)	45
Slika 29 - Spekter kompleksa kurkumina z Fe(II)	45
Slika 30 - Spekter kurkumina z Fe(II) in α -tokoferolom	46
Slika 31 - Strukturna formula α -tokoferola	46
Slika 32 - (A,B,C) A) etanolna raztopina kurkumina pred dodatkom pufrov; B) etanolna raztopina kurkumina v pufru pH 4, 7 in 10 (od leve proti desni) ter železov kelat kurkumina pri pH 7,2 (skrajno desno); C) primerjava med stabilnostjo čistega kurkumina (levo) in kelata kurkumina pri pH 7.2 (desno)	47
Slika 33 - Primerjava med stabilnostjo čistega kurkumina in kompleksa kurkumin-železo pri pH 10 .	48
Slika 34 - (od leve proti desni) A - kurkumin v pufru s pH 3,7; B - kompleks kurkumina in Fe(II) v pufru s pH 3,7; C- kompleks kurkumina in Fe(II) v pufru s pH 10,0 ; D - čisti kurkumina in Fe(II) v pufru s pH 10,0	48

Slika 35 A in 6B. A) - Topnost kompleksa kurkumin- železo(II) (0,05g /100 ml) in B) – topnost čistega kurkumina(0,05g kurkume/100 mL).....	49
Slika 36 – Topnost in stabilnost kompleksov kurkumina z Fe(II) v vodi primerjavi s čistim kurkuminom pri pH 3,7 in pH 10.....	49

Kazalo preglednic

Preglednica 1 - Produkti kurkume in njihova uporaba.....	15
Preglednica 2 - pKa vrednosti kurkumina.....	17
Preglednica 3 - Lastnosti preizkušanih topil.....	22
Preglednica 4 - Značilni vrhovi za kurkumin (IR spektri).....	25
Preglednica 5 - VIS spektri kurkume v različnih topilih pri valovni dolžini 422.3 nm.....	27
Preglednica 6 - Toksikološki podatki za najbolj obetavna topila(vi: varnostni listi za kemikalije).....	28
Preglednica 7 - TLC analiza ekstraktov in čistega kurkumina z acetonitrilom.....	31
Preglednica 8 - Vrednosti absorbanč kurkumina v ekstraktih kurkume pri valovni dolžini 422.3 nm..	33
Preglednica 9 - Priprava standardne raztopine kurkumina.....	35
Preglednica 10 - Koncentracija kurkumina v ekstraktih kurkume.....	36
Preglednica 11 - Masa kurkumina v posameznih ekstraktih.....	38
Preglednica 12 - Načrt poskusa.....	40
Preglednica 13 - Masa kompleksa kurkumina in železa in z α - tokoferolom).....	41
Preglednica 14 - Predvideno razmerje vezave kurkumin - železo.....	43

Kazalo grafov

Graf 1 - VIS spekter kurkume raztopljene v etanolu (levo) in heksanu (desno).....	27
Graf 2 - VIS spekter vseh 4 ekstraktov (EE- etanolni ekstrakt; PE – parni ekstrakt; OE – oljni ekstrakt; PE/OE surov ekstrakt parne ekstrakcije).....	32
Graf 3 - ATR-FTIR spekter standarda kurkumina.....	33
Graf 4 - ATR-FT IR spekter etanolnega ekstrakta.....	34
Graf 5 - IR spekter čistega kurkumina (Nabati s sod., 2012).....	35
Graf 6 - Umeritvena premica za izračun koncentracije kurkumina v ekstraktih.....	36
Graf 7 - Koncentracija kurkumina v različnih ekstraktih.....	37

POVZETEK

V nalogi smo poskušali pridobiti čim bolj čisti ekstrakt kurkumina iz indijske začimbe kurkuma (*Curcuma longa* Linn.) in nato lipofilni značaj ekstrakta preko vezave na $Fe^{2+}/3+$ spremeniti v bolj hidrofilno molekulo. Molekule, ki vsebujejo β -diketonsko skupino so znane po tem, da lahko tvorijo stabilne komplekse z več valentnimi kovinskimi ioni. Preko teh vezi je mogoča tudi vezava kurkumina na metaloproteine v telesu. S poskusi smo potrdili, da je ekstrakcija kurkumina iz kurkume mogoča tako z organskimi topili kot z vodno paro, čeprav je kurkumin v vodi zelo slabo topna snov. Ekstrakt pridobljen v organskih topilih je imel manjši izkoristek (2,35%), kot ekstrakt pridobljen z vodno paro (2,55%) vendar približno 5x večjo vsebnost kurkumina – $1,1 \times 10^{-3}$ g/L. Železovi (II in III) ioni so tvorili komplekse s kurkuminom v ali brez prisotnosti α -tokoferola, saj je zaradi keto-enolnega dela kurkumina le-ta izjemno primeren ligand za vezavo na železove ione. Večina množinskih razmerjih kompleksov je kurkumin: železo 1:1. Najvišji izkoristek smo dobili pri uporabi čistega kurkumina in Fe(II) in sicer 63,5%. Najmanjši izkoristek je dal ekstrakt parne destilacije in sicer 3,9%. Na tvorbo kompleksov bistveno vpliva koncentracija kurkumina oziroma njegova čistoča. Valenca železovih ionov Fe (II) ali Fe(III) ne vpliva na nastanek kompleksov kurkumina. Rezultati kažejo, da je Fe(II) sicer bolj primeren za tvorbo stabilnih kompleksov s kurkuminom, vendar tega nedvoumno nismo dokazali, kot tudi ne vpliva oksidacijskega števila na topnost kompleksov. Ugotovili smo, da so kompleksi kurkumina z Fe (II) in Fe (III) v vodi boljše topni kot čisti kurkumin in tudi precej stabilnejši v alkalnem mediju.

ZAHVALA

Iskreno bi se rada zahvalila moji mentorici za strokovno svetovanje, potrpežljivost in spodbudo pri nastajanju raziskovalne naloge. Bila mi je v veliko pomoč skozi celotni proces naloge in mi dala odlične smernice za delo. Ni me iskreno navdušila le nad kemijo in raziskovanjem, temveč tudi k temu, da kot posameznica s svojimi vsakodnevnimi dejanji, pozitivno energijo in delom prispevam k boljši družbi in okolju v katerem se nahajam.

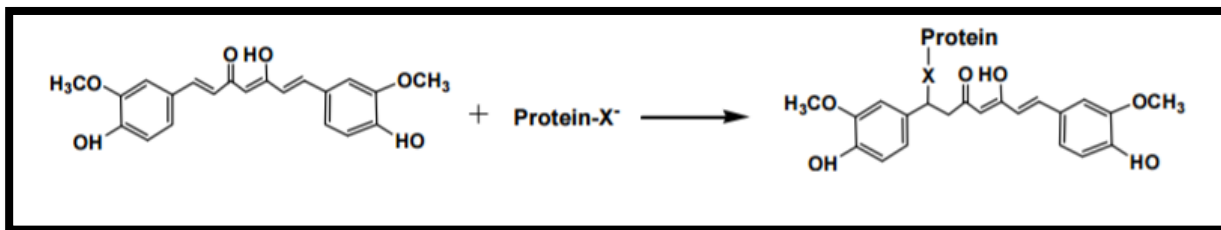
1 UVOD

V mnogih raziskavah je bilo dokazano, da je kurkumin biološko zanimiva in učinkovita snov, ki kaže pozitivne učinke v zaščiti pacientov po srčnem infarktu, pospešuje prehajanje Ca^{2+} ionov, vpliva na delovanje lipidnih peroksidaz in preko tega zvišuje raven holesterola z nizko gostoto (LDH) ter znižuje raven serumskega holesterola (Kanhathaisong s sod., 2011). Pozitivni učniki so bili preučevani tudi pri želodčnih težavah (čir na želodcu) ter vnetnih procesih v tankem in debelem črevesju. Obstaja povezava med kurkuminom in izločanjem pankreatične lipaze, amilaze, tripsina in drugih encimov. Ugotovljeno je bilo, da ima kurkumin antivnetne, antirevmatične, antioksidativne, antimikrobne, antikancerogene in še mnoge druge pozitivne učinke (Naz s sod., 2010). Težava pri uporabi kurkumina je v njegovi nizki topnosti v vodi ter posledično tudi slabi biološki dostopnosti ter hitrem razpadu v alkalnem mediju. Zaradi tega je potrebno razmisliti o primernem dostavnem sistemu za solubilizacijo in stabilizacijo kurkumina v plazmi; to lahko pomeni kemično modificiran kurkumin, na primer, z več hidrofilnimi funkcionalnimi skupinami ali pa preko nanodelcev in enkapsulacije oziroma preko kompleksov, ki ga bodo zaščitili na njegovi poti do tankega črevesja, kjer poteka absorpcija kurkumina. Slednje je predmet številnih mednarodnih raziskav (Song s sod., 2011; Ghosh s sod., 2011; Naz s sod., 2010).

Literaturi viri navajajo številne komplekse kurkumina s kovinami: Fe^{3+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ru^{3+} , Re^{3+} ter mnogimi nekovinami in kovinami, ki jih običajno ne najdemo v kompleksih, kot so Al^{3+} , Ga^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Dy^{3+} , Y^{3+} , Se^{2+} in kovinski oksidi kot je VO_2^+ (Priyadarsini, 2014).

1.1 NAMEN RAZISKAVE

V nalogi bomo poskušali pridobiti čim bolj čist ekstrakt kurkumina iz indijske začimbe kurkuma (*Curcuma longa* Linn.) ter nato lipofilni značaj ekstrakta preko vezave na $\text{Fe}^{2+/3+}$ spremeniti v bolj hidrofilno molekulo. Molekule, ki vsebujejo β -diketonsko skupino so znane po tem, da lahko tvorijo stabilne komplekse z več valentnimi kovinskimi ioni (Kanhathaisong s sod., 2011). Zato kurkumin lahko tvori kelate z borom (Mohr s sod., 2003), bakrom (Barik s sod., 2007), aluminijem (Jiang s sod., 2011), magnezijem in selenom (Zezib s sod. 2010), kot tudi z drugimi kovinskimi ioni. Preko teh vezi je mogoča tudi vezava kurkumina na metaloproteine v telesu. To odpira povsem nove možnosti uporabe in razumevanja delovanja kurkumina v telesu, seveda pod pogojem, da so kovine kurkuminu dostopne (npr. v katalitične mestu encimov).



Slika 1 – Nukleofilna adicija kurkumina s proteini, kjer je X lahko žveplo (S) ali selen (Se) (Priyadarsini, 2014).

Ker pričakujemo, da bodo kompleksi kurkumina z železovimi ioni stabilnejši pri rahlo bazičnem pH (absorbcija v črevesju) ter tudi bolj topni v vodnih raztopinah, nas je zanimalo tudi kakšen vpliv bodo imeli na stabilnost kompleksa drugi antioksidanti, ki so prav tako slabo topni v vodi, kot α -tokoferol (vitamin E). Literaturni viri navajajo, da se antioksidacijska aktivnost kurkumina ob prisotnosti E-vitamina (α -tokoferola) poveča, kar bi pomenilo, da bi tudi kompleks z železom lahko imel povečano učinkovitost. Palipoch s sod. (2014) navaja, da sinergistični učinek bistveno zmanjša tudi oksidativni stres pri uporabi cisplatina v kemoterapiji.

1.2 HIPOTEZE

Postavili smo si naslednje hipoteze:

Hipoteza 1: Ekstrakcija kurkumina iz kurkume bo potekala tako z organskimi topili kot z vodno paro. Ekstrakt pridobljen v organskih topilih bo imel višji izkoristek kot ekstrakt pridobljen z vodno paro ter večjo vsebnost kurkumina.

Hipoteza 2: Železovi ioni bodo tvorili kelate s kurkuminom v ali brez prisotnosti α -tokoferola, saj je zaradi keto-enolnega dela kurkumina le-ta izjemno primeren ligand za vezavo na železove ione.

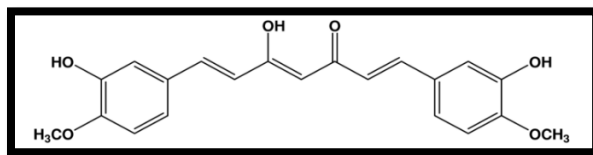
Hipoteza 3: Na tvorbo kompleksov bistveno vpliva koncentracija kurkumina oziroma njegova čistoča. Največji izkoristek pričakujemo pri čistem kurkuminu in najmanjši pri oljnem ekstraktu pridobljen s parno destilacijo.

Hipoteza 4: Valenca železovih ionov (Fe (II) ali Fe(III)) ne vpliva na nastanek kompleksov kurkumina, vpliva pa na topnost kompleksov v bazičnem delu pH.

Hipoteza 5: Kompleksi kurkumina z Fe (II) in Fe (III) so v vodi boljše topni kot čisti kurkumin in stabilnejši v alkalnem mediju.

Hipoteza 6: ATR –FTIR spektroskopija in UV-VIS spektroskopija bosta potrdili nastanek kompleksov kurkumina z železom in sta primerni metodi za raziskave kompleksov kurkumina s kovinskimi ioni.

1. 2.1 Razlaga hipotez



Slika 2 – Strukturna formula kurkumina (Palipoch s sod., 2014)

Kurkumin ima glede na zgradbo tri reaktivna mesta:

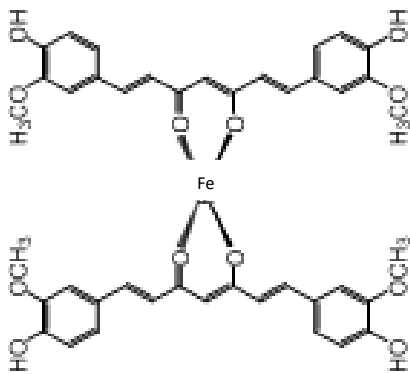
- ✓ dikarbonylni skupini (keto) in
- ✓ dve fenolni skupini.

Metoksi skupine na fenolnem obroču so manj reaktivne. To pomeni, da je kurkumin [1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion] lahko proton donorska molekula, kar vodi v oksidacijo kurkumina. Pričakujemo lahko nukleofilne adicije in reakcije hidrolize.

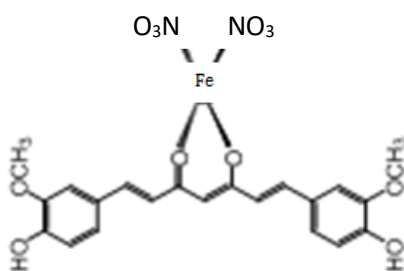
Vse omenjene reakcije imajo v živih sistemih izjemno pomembno vlogo. Posebnost kurkumina je, da kljub svojemu fenolnemu značaju v vodnih raztopinah praviloma ne polimerizira, ampak se razgradi. Čeprav mehanizem razgradnje še ni povsem pojasnjen, raziskovalci menijo, da se razgradnja začne preko dikarbonylnih skupin. Prisotnost lipidov, liposomov, albuminov, cikodekstrinov in številnih drugih molekul, razgradnjo samo še pospeši (Priyadarsini, 2014).

V bioloških pogojih je za kurkumin opisano, da lahko tvori koordinativno vez s kovinskimi ioni tipa ML_2 , kjer ima kovinski ion naboj M^{2+} ali komplekse tipa ML_3 , kjer je naboj kovine $3+$ (Mohammadi s sod., 2005; John s sod., 2005; Kanhathaisong s sod., 2011). V dostopni literaturi so dobro opisani primeri z Al(III) ioni, Zn(II) in Mn(II) ioni.

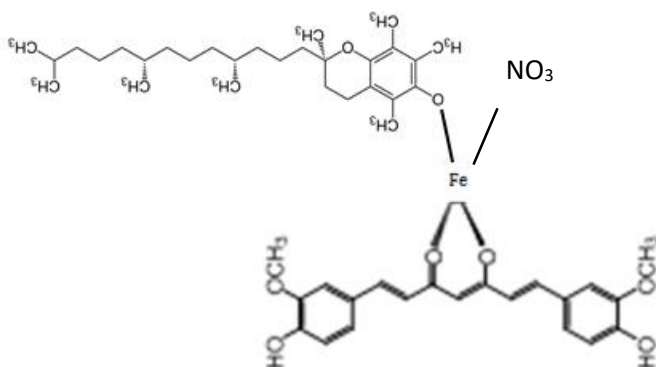
V tej raziskovalni nalogi bomo preučili možnost nastanka kelatov z dvovalentnim in trivalentnim železom. Kot vir železa smo vzeli $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma Aldrich, 98,9%) in $Fe(NO_3)_3$ (Sigma Aldrich, 99,0%). Predvidevali smo, da bi tako z Fe(II) kot Fe(III) lahko nastali kompleksi, ki so predstavljeni na slikah od 1 do 3. Ker so nitrati (V) in sulfati (VI) dobro topne soli, predvidevamo, da vrsta aniona ne bo vplivala na stabilnost kompleksa.



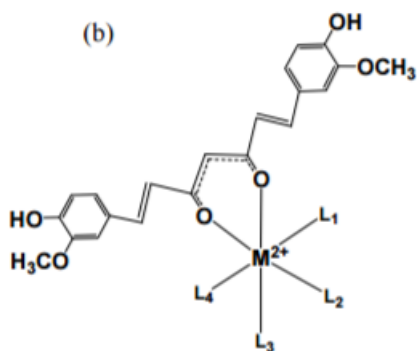
Slika 3 - Hipotetičen primer nastanka kompleksa kurkumina z železom (razmerje 1:2)



Slika 4 - Hipotetičen primer nastanka kompleksa z železom (razmerje 1:1)



Slika 5 - Hipotetičen primer kompleksa železa kurkumina in α -tokoferola



Slika 6 - Hipotetičen primer sinteze kompleksa kurkumina v oktaedrični postavitvi (Palipoch s sod., 2014)

1.3 PREDVIDENE METODE DELA

1. Klasična ekstrakcija s Soxhletovim aparatom ter vodno paro.
2. UV-VIS in ATR-FTIR spektroskopija.
3. Sinteza kompleksov z uporabo vodne kopeli.

Pri delu se lahko pojavijo težave z opremo, ki je na voljo v šol. laboratoriju, saj je praviloma omejena tako v natančnosti kot tudi v obsegu možnih meritev. Analitika zahteva precejšnjo natančnost, rezultati morajo biti ponovljivi, zaradi visoke cene čistega kurkumina pa bomo poskuse izvajali z majhnimi masami/množinami/koncentracijami snovi. Analitska tehnična (Kern; AAA2015) meri $\pm 0,0001\text{g}$ natančno.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 ZGODOVINA UPORABE KURKUME

Ime kurkuma(ang. *turmeric*) prihaja iz latinskega imena *terra merita* (tera = zemlja, merita = zadovoljstvo, nagrada). Najpomembnejši del kurkume in tudi tisti, ki ji daje njeno značilno rumeno barvo, se imenuje kurkumin. Leta 1910 sta ga odkrila Lampe in Milobedzka (Robles s sod., 1998).

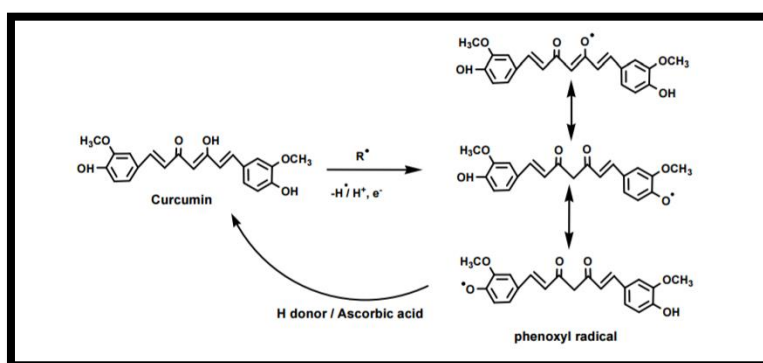
Za kurkumo je zabeleženo, da se kot začimba uporablja že cca. 4000 let. V indijski kuhinji se uporablja tudi kot barvilo. Marco Polo jo je poimenoval indijski žafran. V ljudski medicini pa tudi kot pomoč pri prebavi in pri boleznih mehurja ter ledvic, kot zaščita pred sinusnimi okužbami in pred vnetjem ušes. Kurkuma ima zelo pomembno vlogo tudi v verskih obredih hinduizma, kjer predstavlja življenje, čistost in blaginjo (Kanhathaisong, 2010).

Prve resne raziskave o kurkumi segajo v 20. stoletje. Danes je aktivna komponenta kurkume kurkumin, ki je ena od top raziskovalnih tem na področju biologije, medicine in farmacije (Kanhathaisong, 2010)

2.1.1 Uporaba kurkume v medicini

Kurkuma (oz. njen aktivna snov kurkumin) deluje antioksidativno in protivnetno; številne raziskave dokazujejo njeno antikarcinogeno in antimikrobno delovanje (Robles s sod., 1998; Lao s sod., 2005; Ahsan s sod., 1998; Shi s sod., 2006). Kurkumin zavira delovanje encima topoizomeraza, ki je potreben za reprodukcijo rakavih celic. Kurkumin ima tudi zmožnost ustaviti proliferacijo celic v G2/M fazi pri tumorjih.

Raziskave potrjujejo, da kurkuma ustavlja krvavitve in je zelo dobro naravno zdravilo za celjenje ran. Kurkumina vpliva na zmanjšanje količine histamina v telesu in poveča količino naravnega kortizona ter pospeši izločanje protivnetnih citokinov (TNF- α). Zato deluje protivnetno in posledično tudi protibolečinsko. Pozitivnost uporabe kurkumina je bila opažena tudi pri zaščiti ledvic in delovanju kardiovaskularnega sistema (zmanjševanje količine holesterola nizke gostote). Ekstrakt kurkume oziroma njeno eterično olje zavirajo rast bakterij in parazitov (zelo dobri rezultati za bakterijo *Aspergillus flavus* in *Entamoeba histolytica*). V zadnjem času je veliko raziskav usmerjenih tudi v delovanje kurkumina proti virusu HIV (*human immunodeficiency virus*) saj zavira HIV-1 intergrazo, encim potreben, da preide genetski material proizveden v virusu (v tem primeru HIV), do okužene celice in do njenega DNA. Kurkumin ima izjemne antioksidacijske lastnosti, ki so posledica stabilizacije fenoksilnega radikala, ki nastopa kot intermediat v procesu radikalskih reakcij. Na sliki vidimo regeneracijo fenoksilnega radikala s C vitaminom (askorbinsko kislino) (Funk, 2006).



Slika 7 - Regeneracija fenoksilnega radikala kurkumina s C vitaminom (Taylor s sod., 1992)

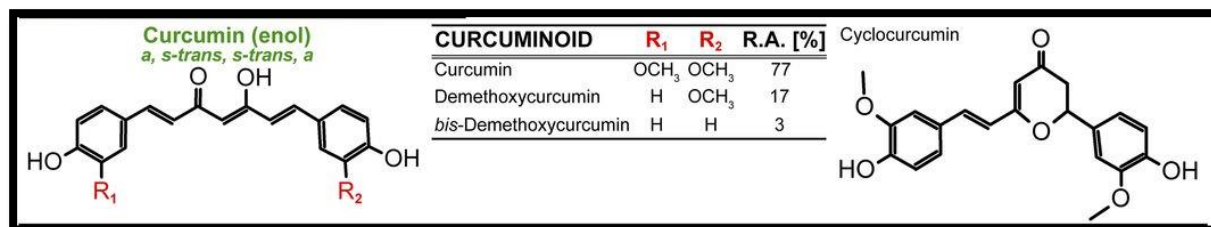
Regeneracija kurkumina preko vodotopnih antioksidantov, kot je C vitamin, običajno poteka z vključevanjem še drugih oksidantov, kot je E vitamin (α -tokoferol) (Khalil s sod., 2013). Kurkumin lahko na ta način bistveno zmanjša delovanje OH, superoksidnih in alkoksi radikalov (Khalil s sod., 2013).

Ime	Opis	Uporaba
Kurkuma (začimba)	Pridobljen iz korena kurkume	V začimbah, v naravnem zdravstvu
Eterično olje kurkume (ekstrakt)	Pripravljena s pomočjo parne ekstrakcije listov kurkume	V prehrani, medicini
Kurkumin (aktivna snov)	Pridobljen s pomočjo ekstrakcije korenov kurkume in s pomočjo kristalizacije	V medicini

2.2 KEMIJSKA ZGRADBA KURKUMINA IN NJEGOVE LASTNOSTI

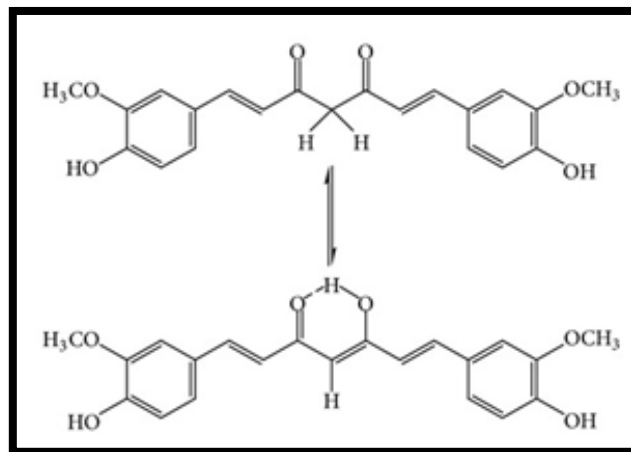
Kurkumin ali 1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion je rumeno-oranžni pigment, pridobljen iz korena kurkume (*Curcuma longa* Linn.). Kurkuma vsebuje proteine (6.3%), maščobe (5.1%), minerale (3.5%) in ogljikove hidrate (69.4%). Eterično olje (5-8% masnih deleže kurkume) največkrat pridobivamo s parno destilacijo in vsebuje α -felanderene (1%), sabiene (0.6%), cineol (1%), borneol (0.5%), zingiberine (25%) in seskviterpine (53%) (Goel s sod., 2008).

Strukturne formule znanih kurkuminoidov pridobljenih iz kurkume, so predstavljene na sliki 8.

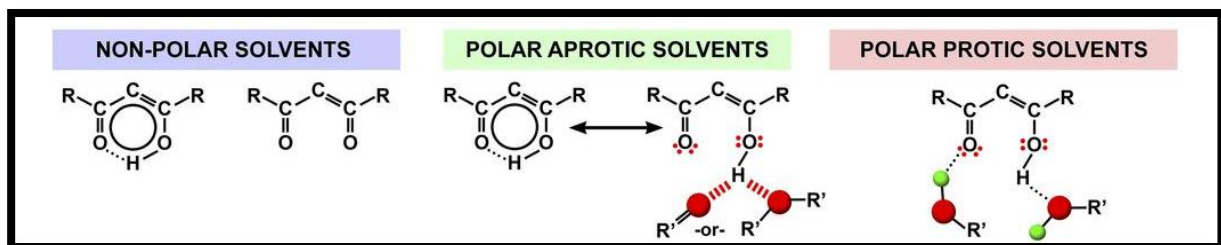


Slika 8 - Struktura štirih najpogostejših kurkuminoidov v kurkumi (Goel s sod., 2008)

Glede na zastopanost v gomolju kurkume, prevladuje kurkumin, sledi demetoksikurkumin, bis-dimetoksikurkumin in ciklokurkumin. Kurkumin (R_1 in $R_2 = \text{OCH}_3$) je molekula z dvema fenolnima obročema, ki jo povezuje krajša konjugirana veriga C atomov z dvema keto skupinama (slika 2), kjer so pojavlja keto-enolna tautomerija. Tautomerija je močno povezana s polarnostjo topil v katerih je kurkumin (Kolev s sod., 2005).



Slika 9 - Keto-enolna tautomerija kurkumina (zgoraj diketo oblika in spodaj keto-enolna oblika) (Kolev s sod., 2005)



Slika 10 - Strukturne spremembe kurkumina v različnih topilih (Goel s sod., 2008)

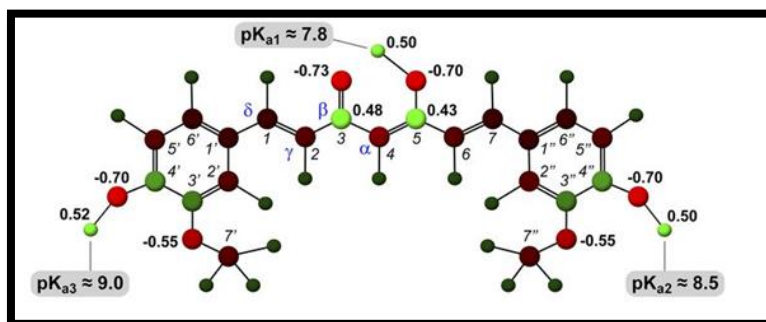
Samo struktura najbolj stabilne oblike, to je enolne konformere kurkumina ($R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$) je res dobro preučena (Balasubramanian, 2006; Kolev s sod., 2005). Preko računalniških simulacij je bilo ugotovljeno, da je najmanj stabilna struktura ciklična oblika (ciklokurkumin) (Kiuchi s sod., 1993).

Strukturne značilnosti kurkumina prispevajo k velikemu deležu intermolekularnih interakcij, ki so bistvene za razumevanje njegovih biološki, kemijskih in fizikalnih lastnosti, obenem pa omogočajo tudi več možnih interakcij te molekule z drugimi biomolekulami v živih organizmih. Te interakcije vključujejo (Goel s sod., 2008):

1. Vodikove vezi na t.i. β -dikarbonilnem delu,
2. Možnost tvorbe vodikovih vezi na obeh OH skupinah fenolnih obročev,
3. Molekulske interakcije na metoksi skupinah,
4. Koordinativne vez s kationi kovin ali nekovin,
5. Možnost tvorbe geometrijskih izomer zaradi prisotnosti dvojnih vezi v alkilni verigi .

V literaturi je opisano preko 70 tarčnih molekul na katere kurkumin lahko neposredno deluje.

Zaradi -OH skupin, je kurkumin šibka organska kislina. Kislost vodikovih protonov v vodnem mediju je prikazana na sliki 11 ter v Preglednici 2.



Slika 11 - Porazdelitev naboja pri kurkuminu v vodi (Goel s sod., 2008)

Preglednica 2 - pKa vrednosti kurkumina

pKa Vrednosti pri T=20°C	
pKa ₁	8,38 (8,34 (Jovanović s sod, 1999)
pKa ₂	9,88 (9,75) (Jovanović s sod, 1999)
pKa ₃	10,51 (10,10) (Bernabe-Pineda s sod., 2004 v Goel s sod., 2008)

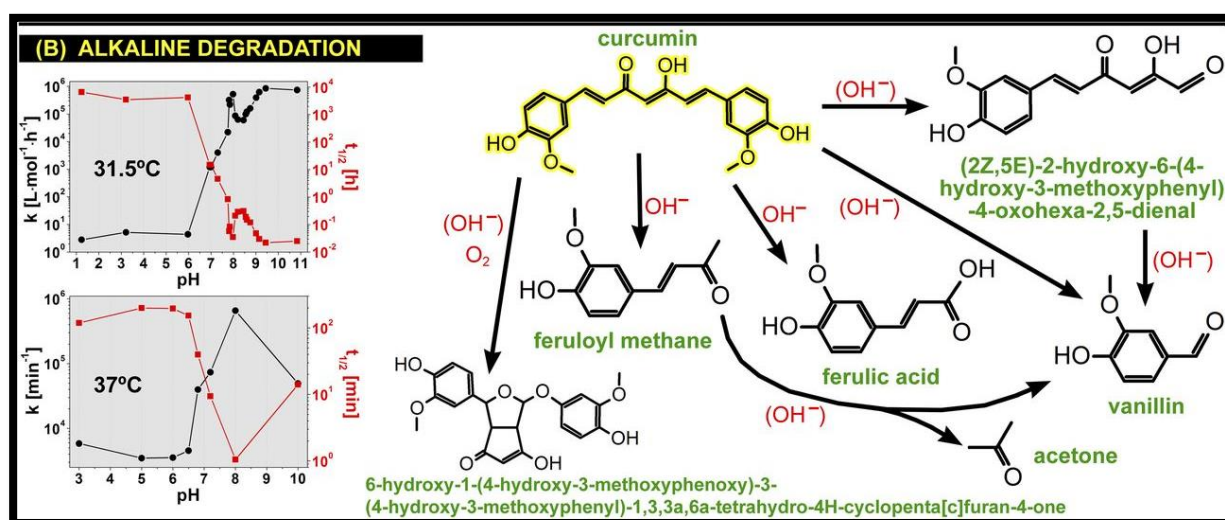
Predvideva se, da je kurkumin v alkoholih, acetonitrilu in DMSO prisoten v keto-enolni obliki. Ta hipoteza je bila eksperimentalno potrjena z FTIR spektroskopijo (Roughley in Whiting, 1973; Unterhalt, 1980; Gorman s sod., 1994; Khopde s sod, 2000), fluorescentno spektroskopijo (Khopde s sod, 2000; Nardo s sod., 2008), kot tudi preko računalniških simulacij (Kolev s sod, 2005; Balasubramanian, 2006; Payton s sod., 2007; Galano s sod, 2009).

Konformacija kurkumina je torej odvisna od okolja v katerem se molekula nahaja, saj okolje narekuje inter in intra molekulske interakcije. V nepolarnih topilih je kurkumin v glavnem kot zaprt *cis-enolni* tautomer, kjer enolni proton in karbonylni kisik ne moreta tvorita vodikovih vezi z drugimi molekulami (Nardo s sod., 2008; Balasubramanian, 2006). V polarnih topilih enolna tautomera zasede odprto *trans-konformacijo* in enolni proton lahko s karbonylno skupino tvori vodikovo vez. V fizioloških pogojih lahko takšna odprta enolna tautomera reagira z vodnimi molekulami v plazmi, citoplazmi, amino skupinami itd. Enolna tautomera je 5 to 8 kcal/mol bolj stabilna od keto oblike (Priyadarsini, 2014).

Kurkumin je v vodi zelo slabo topen. Njegova topnost se povečuje v polarnih aprotičnih topilih. Primer: DMSO - 11 mg/ml (Goel s sod., 2008).

Zaradi slabe topnosti kurkumina v vodi, ga moramo za bio-medicinske aplikacije vedno raztopiti v topilu, kjer je boljše topen. Paziti moramo, da pri tem uporabimo topilo, ki je najmanj toksično (z najvišjim LD₅₀).

Naslednja težava s kurkuminom je, da je postane zelo nestabilen v rahlo alkalnem mediju. Že pri pH > 6.5 prihaja do t.i. alkalne solvolize, kar vidimo iz slike 12. Številni razgradljivi produkti sprožijo radikalno reakcijo (Goel s sod., 2008)

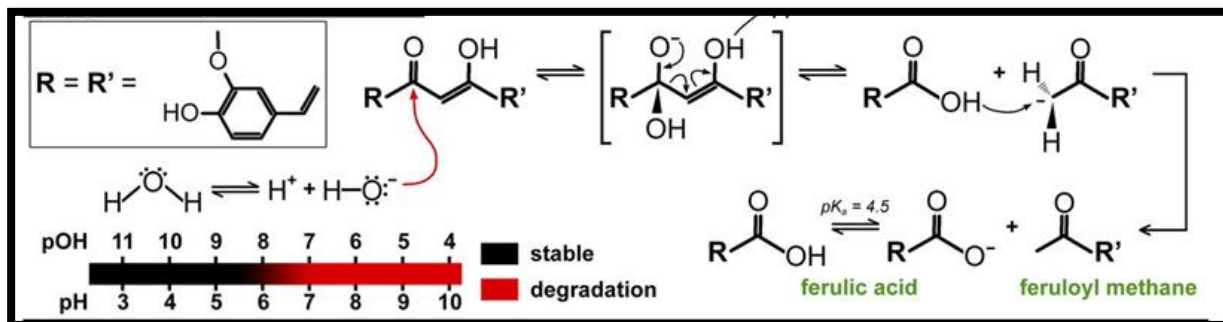
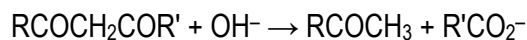


Slika 12 - Vpliv pH in temperature na razgradnjo kurkumina (Goel s sod., 2008)

V kolikor želimo, da je kurkumin dejansko bio dostopen in se absorbira v tankem črevesju, mora biti stabilen tako s kemijskega, kot tudi fizikalnega, mikrobiološkega, terapevtskega ali toksikološkega vidika.

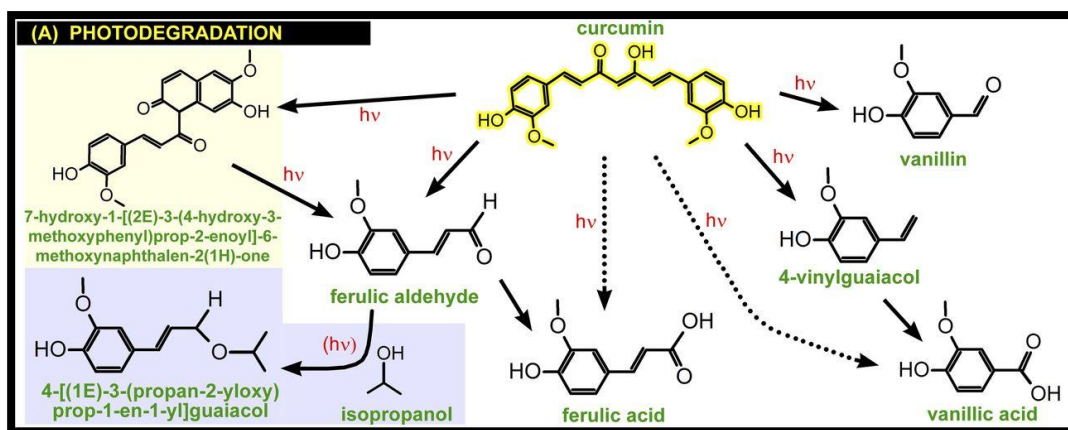
Če povzamemo - za kurkumin raziskave kažejo, da ima vsaj dve veliki težavi, ko gre z njegove medicinske aplikacije; to je oksidativna razgradnja (radikalni mehanizem) in solvoliza (hidroliza), ki se sproži že pri pH nad 6.5. Tønnesen s sod. (1986) navaja, da se v izopropanolu, metanolu in kloroformu lahko pojavi še ciklizacija kurkumina, kar pa se v acetonitrilu ali etil acetatu ne more zgoditi. Alkana solvoliza pri 37°C in pH = 7.2 poteče že v 1 uri. Skoraj celoten kurkumin se pretvori v vanilin in še nekatere druge stranske produkte (glej sliko 12). Pri 37°C in pH = 8.0 50% kurkumina razpade že v 1.1 minuti (Wang s sod., 1997). Pri nekoliko nižji temperaturi, to je 31.5°C ga 50% razpade v 4.6 urah

(pH = 7.3) in v 2.1 minutah pri pH = 8.0 (Tønnesen in Karlsen, 1985). Solvoliza teče po mehanizmu nukleofilne substitucije ali eliminacije (Rahil in Pratt, 1977), kot prikazuje spodnja enačba.



Slika 13 - Shematski prikaz alkalne razgradnje kurkumina (Wang s sod., 1997)

Kurkumin je kromofor, ki izjemno močno absorbira v vidnem delu elektromagnetnega valovanja (v nadaljevanju - EMV) in je zato zelo občutljiv na fotooksidacijo že pri dnevni svetlobi. Ansari s sod. (2005) trdi, da se fotooksidaciji ni mogoče izogniti. 120-urna izpostavljenost čistega kristaliničnega kurkumina dnevni svetlobi, ki je bil pridobljen z etanolno ekstrakcijo, pomeni razpad več kot 70% izhodiščne snovi. Glavni produkt razpada je vanilin (slika 12). Hitrost reakcije je drugega reda glede na kurkumin (Tønnesen s sod. 1986).

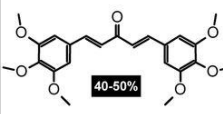
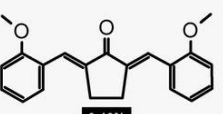
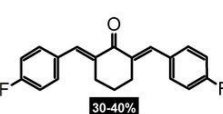
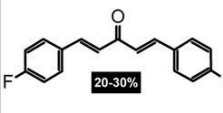
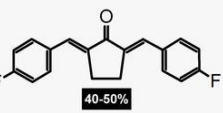
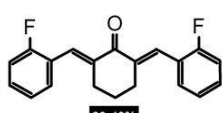
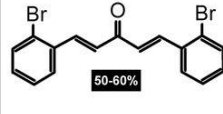
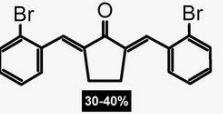
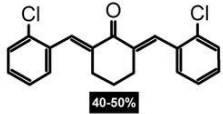
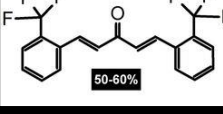
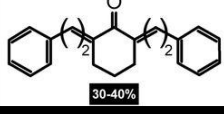


Slika 14 - Razgradnja kurkumina pod vplivom sončne svetlobe (Tønnesen s sod. 1986)

Vse opisane težave delajo kurkumin v farmakološkem smislu precej težavno molekulo. Zato vse klinične raziskave kurkumina opisujejo odmerke, ki se zdijo na prvi pogled izjemno veliki od 8-12 g/dan (oralno). Tudi, če je kurkumin v relativno stabilnih topilih (DMSO/metanol/etanol), ko pride v stik z vodo ali rahlo

bazičnim medijem (kar je za kurkumin že vse kar je nad 6,5), razpade. K njegovemu razpadu deloma pripomorejo tudi encimi, ki imajo kovinske centre.

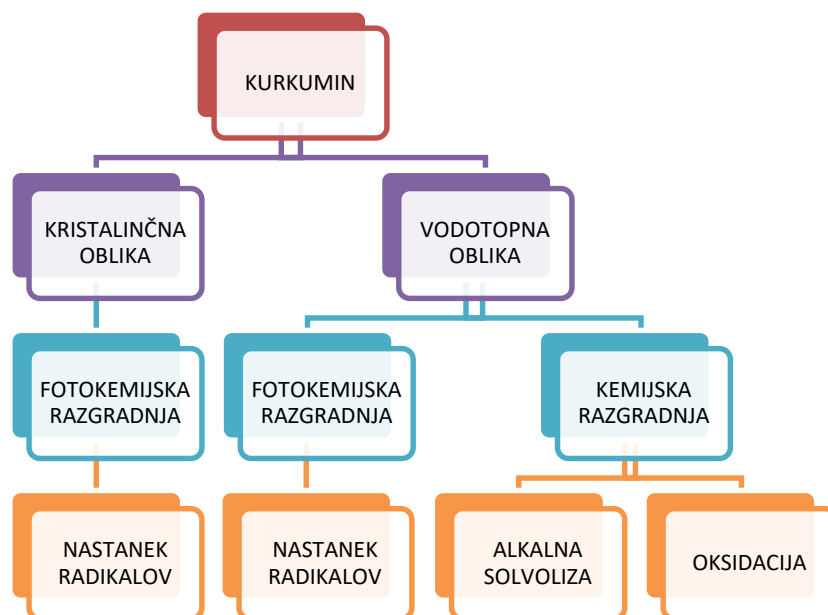
Sintetični kurkumini, v glavnem halogenirane spojine in enokarbonilni sistemi, ki so prikazani na sliki 15 so manj foto občutljivi oz. manj občutljivi na razpad v rahlo alkalnem mediju. Tudi v vodi so bolj stabilni.

ACETONE		BGC 823	HL-60	LS 174T	PC3	HeLa	CYCLO-PENTANONE		CNE	HL-60	PC3	HeLa	CYCLO-HEXANONE		BGC 823	CNE	HL-60	LS 174T	PC3	HeLa
 CURCUMIN >64% 40-50%	16.7 2.3	11.6 0.9	6.4 1.0	15.0 2.9	17.5 2.2		 CURCUMIN >64% 0-10%	32.8 6.7	11.6 0.9	15.0 2.9	17.5 2.2	 CURCUMIN >64% 30-40%	16.7 2.3	32.8 6.7	11.6 0.9	6.4 1.0	15.0 2.9	17.5 2.2		
 20-30%	98.8 19.1	15.2 2.9					 40-50%	2.3 0.9	5.3 2.0			 30-40%	87.3 26.9	77.9 20.7	58.1 15.4	7.4 2.4				
 50-60%	16.1 2.6	4.0 0.6	15.4 6.0	34.2 7.8			 30-40%	32.8 5.0	24.7 4.4			 40-50%	4.4 0.9	98.3 17.8	4.2 2.1	13.8 3.2				
 50-60%	< 10.0		0.35 0.1						1.2 0.3			 30-40%	15.6 4.0		24.3 8.1	61.5 27.1	49.9 18.4			

Slika 15 - Nekateri sintetični kurkumini (Robinson s sod., 2005)

Nekateri sintetični kurkumini imajo večji ali enak citostatični potencial kot naravni kurkumin (na sliki 15 so označeni z rdečo barvo (HeLa)). Sintetični analogi so klasificirani glede na substituiran keto-enolni povezovalc (aceton, ciklopentanon ali cikloheksanon). Problem vseh do sedaj sintetično pridobljenih kurkuminov je velika neznanca o njihovi citotoksičnosti. Za kurkumin je dokazano, da lahko inhibira rakave celice na ravni metastaz, proliferacije in preživetja; teh podatkov za kurkuminove analoge še nimamo ali pa so nepopolni (Kulkarni s sod., 2012).

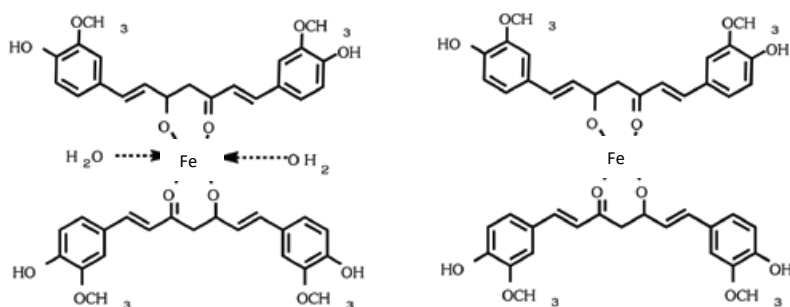
Problem s kurkuminom lahko shematično predstavimo kot vidimo na sliki 16:



Slika 16 - Fotokemijska in kemijska nestabilnost kurkumina

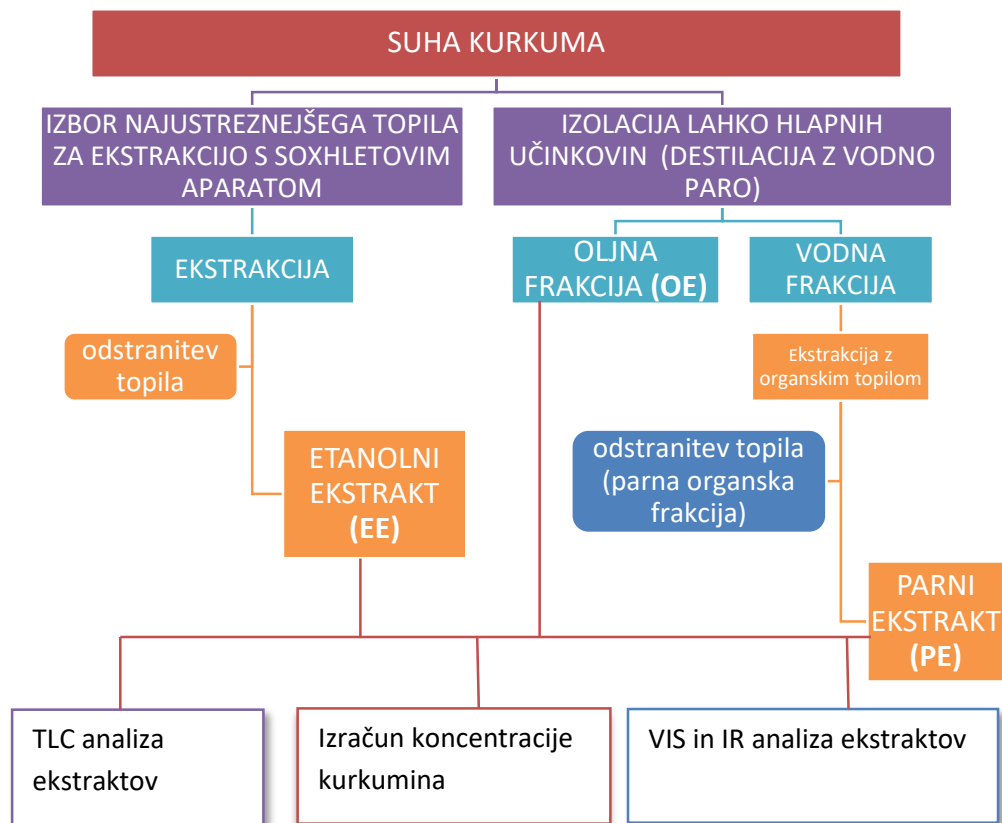
2.3 KURKUMIN- KOVINSKE INTERAKCIJE

α,β -nenasičen β -diketo del molekule kurkumina je odlično mesto za tvorbo kompleksov s kovinskimi ioni. Deluje lahko kot bidentatni ligand, kar pomeni, da lahko tvori stabilne strukture, kjer sta kovina in kurkumin v razmerju 1:2. Ob oktaedrični razporeditvi okoli centralnega atoma kovina, bi bilo mogoče tudi razmerje 1:3 (Khalil s sod., 2013) ali celo višja razmerja, vendar so manj verjetna.



Slika 17 – možne strukture kompleksa kurkumina in železa v vodni raztopini

3 RAZISKAVA – 1. DEL



Organigram 1: Načrt 1. dela praktičnega dela

3.1 IZVEDBA PRAKTIČNEGA DELA

3.1.1 Preizkus topnost kurkume v različnih topilih

Preglednica 3 - Lastnosti preizkušanih topil

topilo	proizvajalec	čistoča	Dipolni moment ¹ (Debys)
Heksan	Riedl – de Haen	99.8%	≤ 0.1
Dietil eter	Backer	99.5%	1.15
Etil acetat	Sigma – Aldrich	99.5%	1.78
Dimetil sulfamid (DMS)	Fluka	99.9%	1.50
Aceton	Sigma – Aldrich	99.5%	2.76
Metanol	Sigma – Aldrich	99.8%	1.70
Etanol	Sigma – Aldrich	99.8%	1.69

¹ Električni dipolni moment je fizikalna količina, ki označuje električni dipol; je vektorska količina, katere velikost je enaka produktu pozitivnega naboja in razdalje med nabojema, usmerjen pa je v smeri od negativnega proti pozitivnemu naboju. Mednarodni sistem enot določa za električni dipolni moment sestavljeno enoto $As\ m$. Za navajanje električnih dipolnih momentov molekul pa se uporablja tudi mnogo manjša enota - Debye: $1\ debye = 3,3336 \cdot 10^{-30}\ As\ m$ (povzeto po US Department of Commerce, National BureauStandards, 1971).

Ocetna kislina	Sigma – Aldrich	99.8%	1.74
----------------	-----------------	-------	------

Za preizkus topnosti smo k 100 mL vsakega topila (Preglednica 3) dodali 0,0500g ($\pm 0,0001$) kurkume. Vzorec kurkume je bil pridobljen iz korenine *Curcuma longa* (distributer Žito d.o.o (izvor: Indija) rok uporabe: 8.9.2019). Na ta način smo pridobili osem raztopin s koncentracijo $\approx 0,5\text{g/L}$.

Kot kontrolo smo uporabili deionizirano vodo (pridobljeno v šol. laboratoriju; prevodnost $\approx 5\ \mu\text{S/m}$). Topnost kurkume v vodi je bila izjemno slaba, saj delci kurkume lebdijo v raztopini in so vidni že s prostim očesom (slika 21).

Najustreznejše topilo smo določili tako, da smo vsaki od osmih raztopin kurkume izmerili absorbanco z Vernierjevim SpectroVIS spektrofotometrom (program Logger Pro 4.10.1) pri valovni dolžini 422,3 nm, kjer je imel naš vzorec kurkume svoj absorpcijski maksimum v vidnem delu elektromagnetnega valovanja.

3.1.2 Ekstrakcija s soxhletovim aparatom

Sestavili smo Soxhletov aparat in v celulozni tulec natehtali znano maso mlete kurkume ($\approx 15,0\ \text{g}$). Dodali smo 150 mL topila (etanol, 99,8% (Sigma Aldrich)) in nato preko kuhalne plošče segrevali toliko časa, da smo dosegli 30 refluksov (*nateg*). Po končani ekstrakciji smo z rotavaporjem (IsoLab Germany) odstranili topilo (etanol).

3.1.3 Destilacija z vodno paro

Čeprav je kurkuma zelo slabo topna voda, smo predvidevali, da bi z destilacijo z vodno paro lahko pridobili nekaj kurkumina; predvsem lahko hlapnih olj katerih glavni sestavina so seskviterpenoidi². Ker nam parorazvijalec ni bil na voljo, smo uporabili modificirano metodo parne ekstrakcije, ki se v vsakdanjem življenju uporablja za pripravo kavnega napitka – kafetiero (250 ml). V predel, kamor se običajno da mleta kava, smo dali mleto kurkumo (15,0 g) in nato preko grelne plošče, 10-x ponovili postopek ekstrakcije. Vsakokrat smo uporabili 15,0 mL deionizirane vode. Pridobljene ekstrakte smo zbirali v lij ločniku.

² Seskviterpenoidi so oksidirana oblika terpenov, ki so najpogostejše sestavine eteričnih olj in pogoste sestavine smol. Zgrajeni so iz izoprena (C_5H_8). Splošna formula terpenov je $(\text{C}_5\text{H}_8)_n$, kjer n pomeni število izoprenskih enot. (zapiski predavanj; FF, 2016; dostopno na: <file:///C:/Users/Uporabnik/Downloads/1-Terpeni.pdf>) povzeto: 29.12. 2016.



Slika 18 - Kafetiera uporabljena v nalogi

3.1.3.1 Ekstrakcija kurkumina iz vodne frakcije z organskim topilom

Počakali smo, da ste se obe frakciji (oljna in vodna) v liju ločniku med seboj ločili. Oljno frakcijo smo shranili za nadaljnje analize, vodni pa smo dodali 1,2-dikloroetan (Sigma Aldrich, 99%), s katerim smo želeli iz vode pridobiti čim več snovi, ki so v njej slabo topne (kurkumin in kurkuminu podobne snovi). 1,2-dikloroetan je bil izbran zaradi dobre ločbe z vodo. Ugotovili smo, da je kurkumin sicer dobro topen v metanolu, etanolu in acetonu, vendar uporaba teh topil ločitev z vodo ne bi omogočala. Pawar s sod. (2014) navaja, da je za izolacijo kurkumina dobra izbira tudi čisti benzen in nato pretvorba v vodo. topno sol z uporabo NaOH(aq), čemur sledi obarjanje s HCl(aq). Za ta postopek se zaradi strupenosti benzena nismo odločili (Robles, 1998). Izbira diklorometana se je zdela ustreznejša, saj 1,2-dikloroetan med enostavnimi kloriranimi ogljikovodiki sodi med manj strupena topila, vendar je tudi pri uporabi tega topila potrebna velika previdnost (preprečitev neposrednega vdihovanja in kontakta s kožo) (NIOSH, 2016).

Po odstranitvi topila, smo ekstraktu dodali še brezvodni Na₂SO₄, premešali in počakali 5 min. Sledila je filtracija in tehtanje produkta.

3.2 IZKORISTKI EKSTRAKCIJ

Po odstranitvi topila, smo ekstrakte ponovno stehali ter izračunali izkoristek ekstrakcije.

$$\text{Izkoristek} = \frac{\text{masa čistega ekstrakta}}{\text{masa kurkume}} \times 100$$

3.3 TLC ANALIZA EKSTRAKTOV

Da bi preučili koliko in predvsem katere snovi smo pridobili z ekstrakcijo, smo načrtovali izvedbo tankoplastne kromatografije. V ta namen smo uporabili Machery-Nagel silikagelske plošče, dimenzij 5 x10 cm z 20 mm nanosom SiO₂ in kot mobilno fazo acetonitril (Carl-Roth, 99,98%). Različni viri za ločevanje kurkuminooidov navajajo različne mobilne faze in razvijalce ločenih komponent. Kulkarni s sod. (2012) predlaga kot učinkovito mobilno fazo kloroform : metanol= 95:5, Lee s sod.(2013) acetonitril

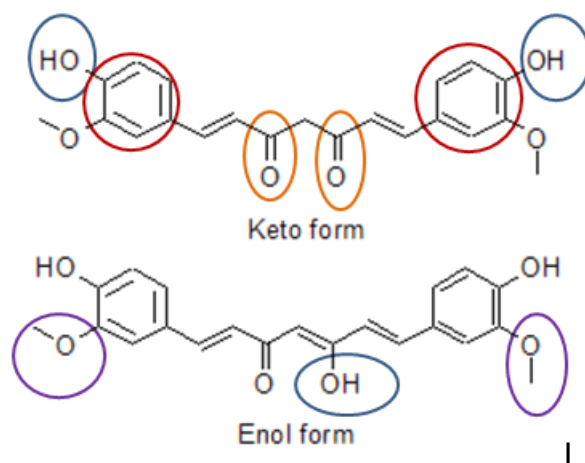
in vodo (99:1), Pawar s sod.(2014) heksan in etilacetat (7:3). Ker različni avtorji navajajo, da več kot 90% ekstrakta predstavljal kurkumin, smo se odločili, da bomo kot mobilna fazo izbrali polarno aprotično topilo acetonitril ter vodo (99:1), ki po navedbah Lee-ja s sod.(2012), da najboljšo ločbo kurkumina.

3.4 VIS IN ATR-FTIR SPEKTROFOMETRIČNA ANALIZA EKSTRAKTOV

Za analizo IR spektrov vseh ekstraktov so bili pomembni predvsem vrhovi, ki so predstavljeni v preglednici 3.

Preglednica 4. Značilni vrhovi za kurkumin (IR spektri)

Vrh (valovno število; cm ⁻¹)	Vibracija vezi
3293	širok pas zaradi O-H vezi
3508	Oster vrh zaradi O-H vezi (alkilni del)
3014	C - H (sp ² v verigi)
≈1600	C - C (aromatski obroč) in C=C vezi
1506	C=O
1280	C - O
1023	C - O - C
959	C-H v benzenovem obroču (<i>trans</i> vibracije)
713	C-H v benzenovem obroču (<i>cis</i> vibracije)



Slika 19 - Strukturna formula kurkumina v njegovi diketo in keto-enolni obliki z označenimi funkcionalnimi skupinami (Yuan s sod., 2012)

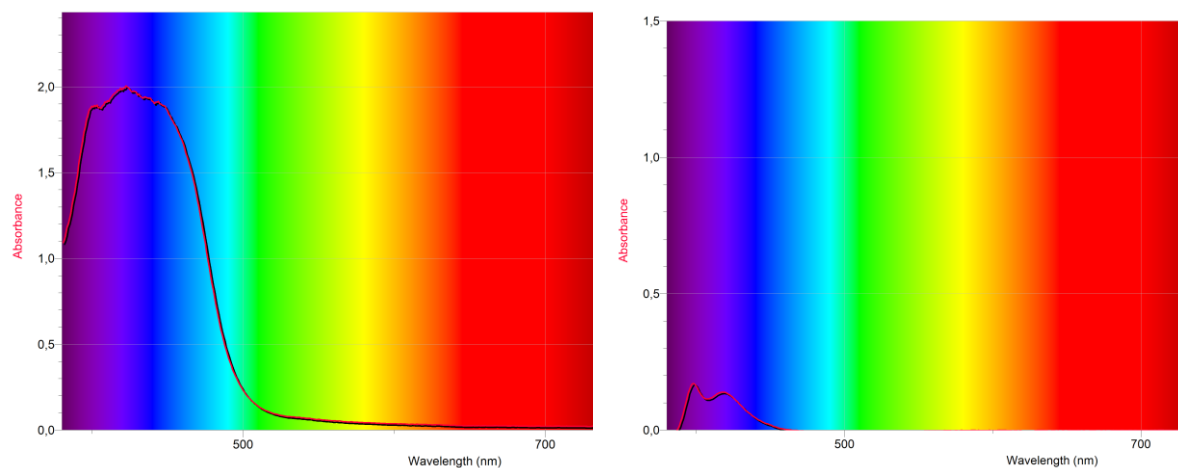
4 REZULTATI

4.1 PREIZKUS TOPNOSTI KURKUME V RAZLIČNIH TOPILIH

Kurkuma in kurkumin sta močno rumeno obarvani snovi, zato je bilo pričakovano, da je v VIS delu spektra največja absorbanca v modrem delu. Vendar na absorbanco vpliva tudi izbira topila (slika 3). Zato so VIS spektri kurkume v različnih topilih nimajo vedno maksimalne absorbance pri isti valovni dolžini, zaradi različne topnosti pa tudi vrednosti absorbanc niso enake. Na grafu 3 vidimo razliko v VIS spektrih kurkume v etanolu in heksanu ter vrednosti absorbanc pri valovni dolžini 422.3 nm (λ_{\max} za kurkumin) različne (preglednica 5). V obeh primerih bilo uporabljene 0,05 g kurkume/100 mL topila.



Slika 20. Slaba topnost kurkume v vodi v vodi (delci kurkume lebdijo v raztopini in se počasi usedajo).



Graf 1 - VIS spekter kurkume raztopljene v etanolu (levo) in heksanu (desno)

UV-VIS spekter kurkumina ima dva močna absorpcijska vrhova; od 410- 420 nm in v UV delu pri 265 nm (posneto z UV spektrofotometrom BioLambda, Perkin Elmer). Pri 425 nm je molarni absorpcijski koeficient $55.000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Khalil s sod., 2013).

Preglednica 5. VIS spektri kurkume v različnih topilih pri valovni dolžini 422.3 nm

TOPILO	Absorbanca pri λ 422.3 nm (± 0.03 nm)
1. Heksan	0.12
2. Dietil eter	1.82
3. Etil acetat	1.80
4. Dimetil sulfamid (DMSO)	2.03
5. Aceton ³	1.80
6. Metanol	2.00
7. Etanol	2.02
8. Etanojska kislina	1.95

Na osnovi rezultatov predstavljenih v Preglednici 3 smo kot najustreznejša topila določili: **metanol, etanol in DMSO**, saj ima v njih kurkuma najvišjo absorbanco pri valovni dolžini 422.3 nm. Ker je DMSA topilo, kjer iz slike 2 vidimo, da ekstrakt ni rumene barve, ampak temno zelen (številka 4), se zanj

³ Problem acetona pri VIS meritvah v šol. laboratoriju nastopi zaradi kivet. Aceton raztaplja kivete, zato je bil a naši raziskavo neprimeren (opomba avtorice).

nismo odločili. Zaradi cenovne dostopnosti, učinkovitosti in toksikoloških podatkov, smo se zato za izolacijo kurkumina iz kurkume uporabili etanol (številka 7 na sliki 2 (od leve proti desni)).



Slika 21 - Uporaba različnih topil za ekstrakcijo kurkumina iz kurkume (desno - Primerjava med topnostjo kurkume v vodi in etanolu)

Preglednica 6. Toksikološki podatki za najbolj obetavna topila (vi: varnostni listi za kemikalije)

Topilo	LD50 (za podgane, oralno)
metanol	5.6 g/kg
etanol	7.1 g/kg
DMSO	18.0 g/kg.

Potrdili smo, da je kurkuma v vodi res zelo slabo topna. Njena topnost se povečuje v naslednjem vrstnem redu:

heksan/voda < etil acetat/acetona < dietil eter < etanojska kislina < metanol < etanol < DMSO.

Ta vrstni red precej sovпада s topnostjo kurkumina, ki ga je predpostavil Khopode s sod. (2000).

4.2 IZKORISTEK EKSTRAKCIJE

4.2.1 Ekstrakcija z soxhletovim aparatom

Začetna masa (kurkume) = 15.0005g (± 0.0001 g)

V(etanola,99,8%)= 150,0 mL

Trajanje ekstrakcije: 7 ur 25 min (30 refluksov)

Rotavapor (IKA PB10): 89 rpm; temperatura: 45°C



Slika 22 - Ekstrakcija kurkumina z etanolom v Soxhletovi aparaturi ter ostranitev topila z rotavaporjem

Masa čistega ekstrakta= 0,3520g ($\pm 0,0001$ g)

Izkoristek ekstrakcije = $\frac{0,3520}{15,0005} \times 100 = 2,35\%$

Napaka meritev: 0,02%

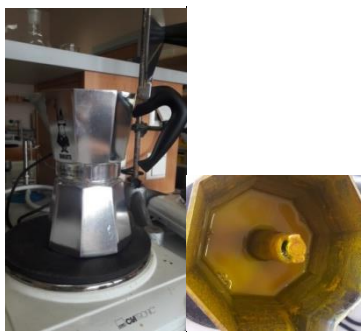
Opis ekstrakta: gosta, poltrdna rjavo-oranžna snov, prijetnega, zelo intenzivnega vonja po kurkumi.

4.2.2 Hidro-ekstrakcija s kavnim aparatom

Masa(kurkume) = 15,0000 g(± 0.0001 g)

V(deionizirane H₂O)= 150,0 mL(± 1 mL)

Trajanje ekstrakcije: 2h (10 ponovitev)



Slika 23 - Modificirana parna ekstrakcija s kavnim avtomatom.

Vodna faza je bila dejansko sestavljena iz nepolarne - oljne faze, ki je plavala na površini ekstrakta, ter vodne faze pod njo. Oljno fazo smo previdno odstranili z lijem ločnikom in ji, kot sušilno sredstvo, takoj dodali brezvodni natrijev sulfat (VI). Vodni fazi smo dodali C₂H₄Cl₂ in v liju ločniku ponovno močno stresali. Po nekajkratnih ponovitvah se je organska faza obarvala močno rumeno. Topilo smo nato ponovno odstraniti z rotavaporjem, dodali brezvodni natrijev sulfat (VI) (proizvajalec Zorka Šabac, p.a) in tako pridobili (čistejši) ekstrakt.

Masa čistega ekstrakta: 0.38350 g ($\pm 0,00001$ g)

- Masa oljnega ekstrakta (po odstranitvi topila): 0,1521 g ($\pm 0,0001$ g)1,01%
- Masa parnega ekstrakta (po odstranitvi topila): 0,2314 g ($\pm 0,0001$ g)..... 1,54%

$$\text{Izkoristek ekstrakcije} = \frac{0,38350}{15,0000} \times 100 = 2,55\%$$

Napaka meritev: 0,11%

Opis ekstraktov:

Oljni ekstrakt: svetlo rumena oljnata tekočina, podobnega (vendar manj izrazitega vonja) kot etanolni ekstrakt.

Parni ekstrakt: svetlo rumena bistra tekočina, podobnega (vendar manj izrazitega vonja) kot oljni ekstrakt.



Slika 24 - Ločitev oljne faze od vodne faze z lijem ločnikom (levo) ter vizualna primerjava vse pridobljenih ekstraktov (pred popolno odstranitvijo topila).

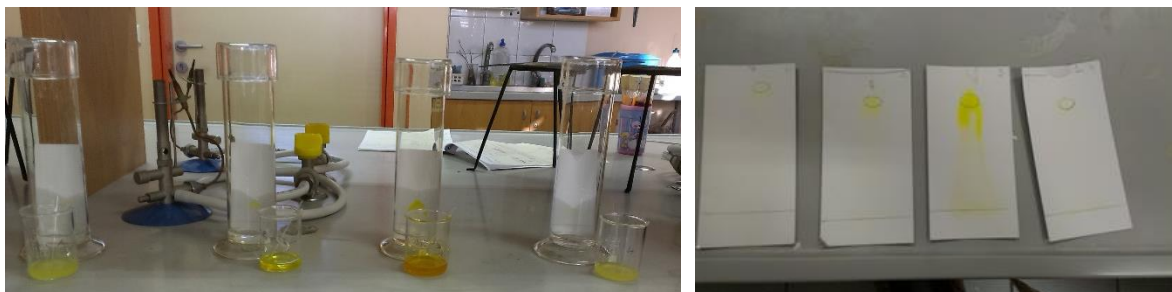
Ekstrakti, ki smo jih pridobili so v nadaljevanju označeni kot:

1. Etanolni ekstrakt (Soxhlet) - EE
2. Parni ekstrakt - PE
3. Oljni ekstrakt – OE
4. Lij ločnik (mešanica PE/OE)

4.3 ANALIZA PRIDOBLENIH EKSTRAKTOV

4.3.1 Analiza s tankoplastno kromatografijo (tlc)

Za tankoplastno kromatografijo smo kot mobilno fazo uporabili acetonitril (Sigma-Aldrich; 99,8%) in kot stacionarno fazo Machery-Nagel TLC plošče, prevlečene s 0,20 mm SiO₂ (5 x 10 cm). Na startno črto smo s kapilaro v tanki črti nanесли ekstrakte in, ko so bili valji za razvijanje kromatogramov nasičeni, vanje položili kromatografske plošče. Ko je mobilna faza bila približno 1 cm pod vrhom, smo plošče vzeli iz valjev, označili do kam je pripotovala mobilna faza, počakali, da so se TLC plošče posušile in nato z grafitnim svinčnikom označili ločene komponente ter izračunali retencijske faktorje, R_f. Enako smo ponovili z standardom kurkumina.⁴



Slika 25 – Tankoplastna kromatografija ekstraktov (levo) in razviti kromatogrami (desno).

Preglednica 7 - TLC analiza ekstraktov in čistega kurkumina z acetonitrilom

Ekstrakt	R _f	Prisoten kurkumin
EE	0,88	da
PE	0,89	da
OE	0,88	da
PE/OE	0,86	da
Standard (čisti kurkumin (Sigma Aldrich))	0,88	-

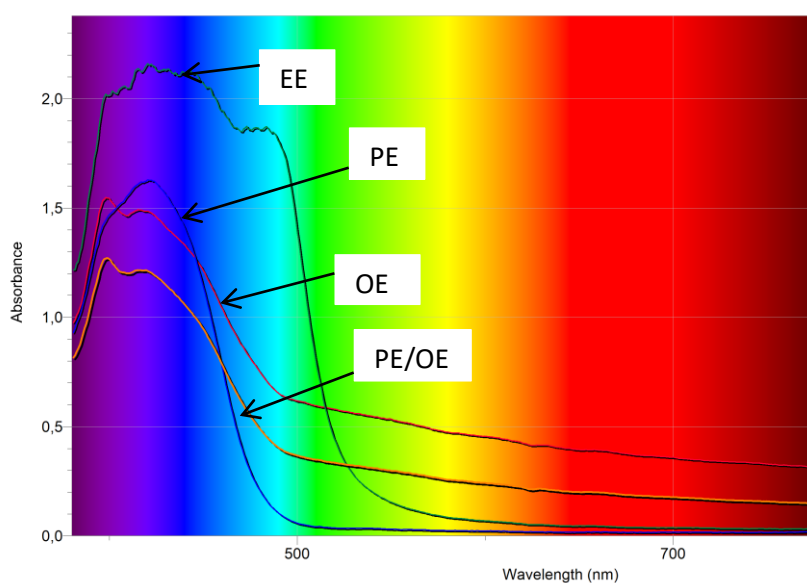
Tankoplastna kromatografija je bila načrtovana tako, da je bila optimalna za izolacijo kurkumina, vendar smo pričakovali, da se bo poleg kurkumina ločilo še nekaj drugih (kurkuminu podobnih) snovi. Jasna rumena lisa v vseh primerih ekstraktov, zelo primerljivi R_f faktorji in ujemanje s standardom, niso

⁴ Optimalno bi bilo, da bi vse ekstrakte, skupaj s standardom nanесли na isto ploščo, vendar smo imeli na voljo zelo ozke kromatografske kolone in temu ustrezne ozke TLC plošče (opomba avtorice).

dopuščali dvomov, vendar je bila verjetnost, da smo ekstrahirali le eno komponento in drugih spojin v zmesi ni bilo, majhna. Dopuščamo možnost, da se kromatogram morda ni v celoti razvil, saj so R_f za kurkumin, demetoksi kurkumin in bis demetoksi kurkumin običajno zelo blizu skupaj (Modasiya s sod., 2012). TLC analizo bi bilo smiselno ponoviti z drugo mobilno fazo ali pa morda izboljšati vizualizacijo vseh ločenih snovi. Ker smo v nadaljevanju želeli ugotoviti kolikšna je koncentracija kurkumina, po različnih orositvenih reagentih nismo posegali.

Kurkumin smo s TLC plošč postrgali v 10 mL epruvete, dodali malo etanola in močno stresali. Rahlo obarvano raztopino smo prenesli v 50 mL čase in postopek ponavljali toliko časa, da raztopina s postrganim kurkuminom ni bila več obarvana. Nato smo topilo odhlapeli, izoliranim produktom pa izmerili absorbanco pri 422.3 nm (graf 2 in Preglednica 8).

4.3.2 Analiza uv-vis spektrov (po tlc ločbi)



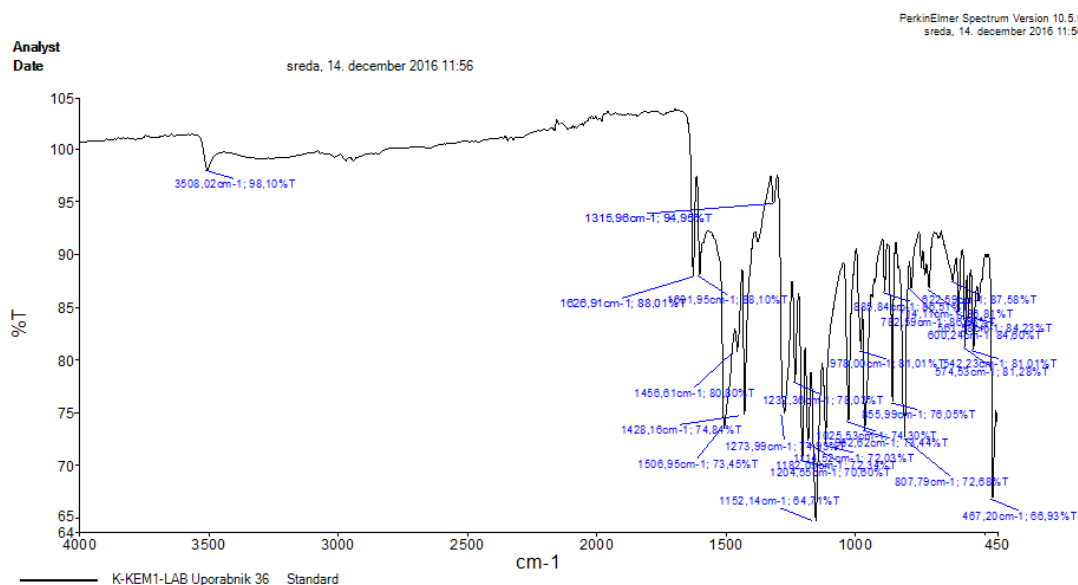
Graf 2 - VIS spekter vseh 4 ekstraktov (EE- etanolni ekstrakt; PE – parni ekstrakt; OE – oljni ekstrakt; PE/OE surov ekstrakt parne ekstrakcije)

Preglednica 8 - Vrednosti absorbanc kurkumina v ekstraktih kurkume pri valovni dolžini 422.3 nm

Ekstrakt	A (422.3 nm)
EE	2,189
PE	1,673
OE	1,499
PE/OE	1,215

4.2.3 Analiza IR spektrov

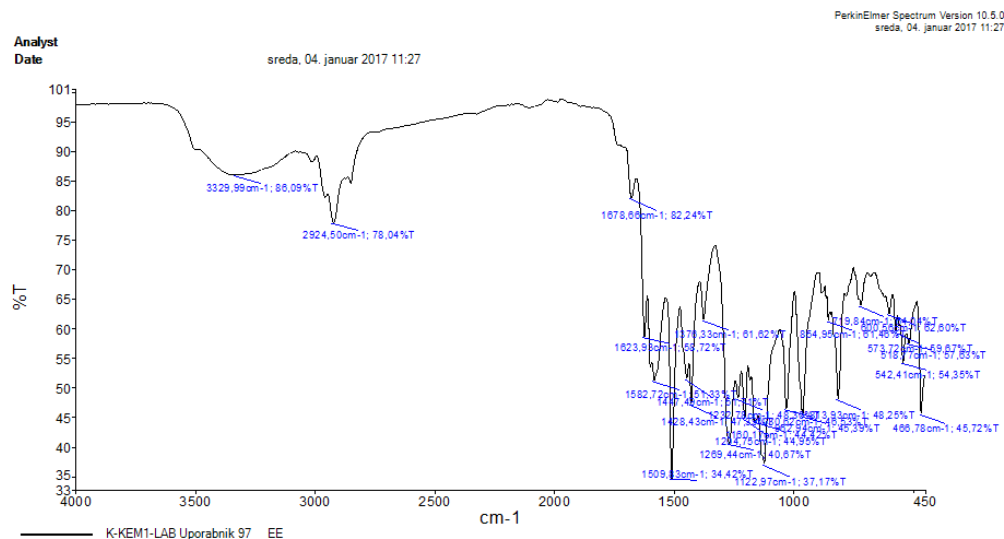
Vsem vzorcem smo posneli še ATR-FTIR spektre in na osnovi značilnih vrhov sklepali o sestavi spojin, ki smo jih ekstrahirali. Kot vidimo iz grafa 3, je standard kurkumina pokazal jasne vrhove pri 3508 cm^{-1} (OH skupina), skupino vrhov okoli 1600 cm^{-1} kot posledico vibracije C-C vezi v aromatskih obročih, 1506 cm^{-1} zaradi vibracije C=O vezi, 1052 cm^{-1} zaradi vibracij C-O-C vezi in vse značilne vibracije zaradi C-H vezi v benzenovih obročih (960 cm^{-1} in 713 cm^{-1}).⁵



Graf 3 – ATR-FTIR spekter standarda kurkumina

⁵ Primerjava ATR -FTIR spektra čistega kurkumina s Mohanovim s sod. (2012) kaže določena odstopanja, ki so lahko posledica uporabe različnih merilnih instrumentov ali tehnik meritev (opomba avtorice) .

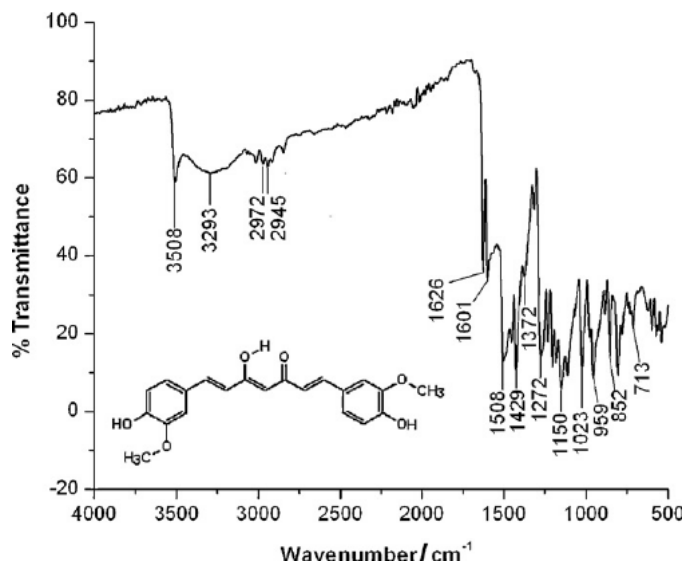
Ker je bilo pri ekstraktu pridobljenem s parno destilacijo zelo težko odstraniti vso vodo (ki moti IR meritve oz. prekrije značilne vrhove), smo IR spekter posneli le za ekstrakt pridobljen s Soxhletovim aparatom (graf 4).



Graf 4- ATR-FT IR spekter etanolnega ekstrakta

Kot vidimo iz grafa 6, je standard kurkumina pokazal jasne vrhove pri $\approx 3329 \text{ cm}^{-1}$ (OH skupina). Ta vrh je širši in bolj izrazit kot pri čistem standardu. Izrazit je vrh pri 2924 cm^{-1} , ki bi lahko bil značilen za vibracije C-H. Vibracija pri 1623 cm^{-1} , ki jo opazimo v čistem kurkuminu je v spektru etanolnega ekstrakta zelo neizrazita, pojavi pa se vrh pri 1678 cm^{-1} , ki pripada C=C vezem (aromatski obroč). Opazimo tudi nekoliko premaknjeno vibracijo pri 1509 cm^{-1} , ki je posledica prisotnosti C=O vezi, 1052 cm^{-1} zaradi vibracij C-O-C vezi in vse značilne vibracije zaradi C-H vezi v benzenovih obročih (960 cm^{-1} in 713 cm^{-1}).⁶ Na osnovi IR analize smo zaključili, da etanolni ekstrakt kurkume predstavlja precej čist kurkumin. Tudi primerjava s spektrom, ki ga je v transmissijski tehniki posnel Nabati s sod. (2014), to potrjuje.

⁶ Primerjava ATR -FTIR spektra čistega kurkumina s Mohanovim s sod. (2012) kaže določena odstopanja, ki so lahko posledica uporabe različnih merilnih instrumentov ali tehnik meritev (opomba avtorice) .



Graf 5 - IR spekter čistega kurkumina (Nabati s sod., 2012)

4.4 DOLOČITEV KONCENTRACIJE KURKUMINA V EKSTRAKTIH

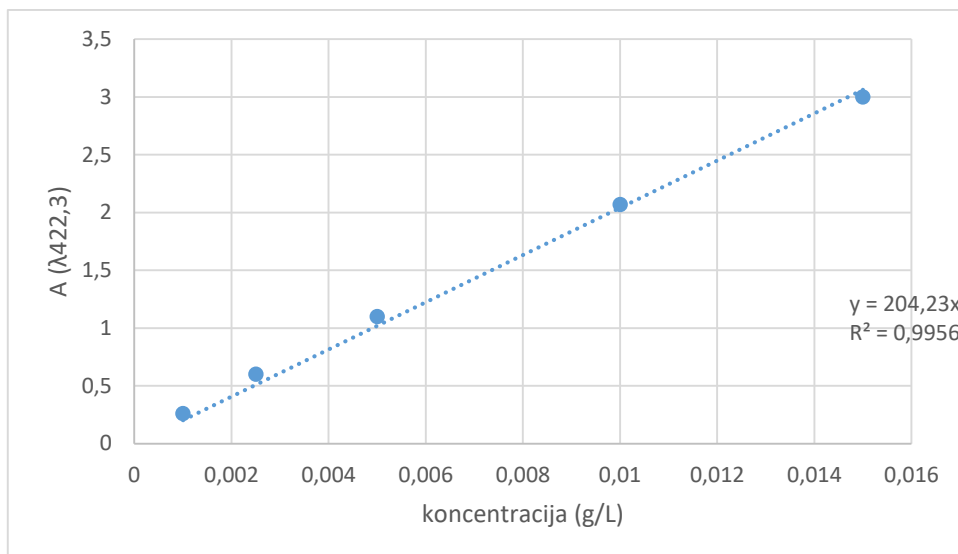
Za določitev koncentracije kurkumina v pridobljenih ekstraktih smo si najprej pripravili standardno⁷ raztopino kurkumina 0,05g/L v etanolu in nato z razredčitvami le-te še naslednje koncentracije: 0,0010g/L, 0,0025g/L, 0,0050g/L, 0,0100g/L in 0,0150g/L.

Pri valovni dolžini 423.3 nm smo za vse raztopine izmerili njihov absorbanco in dobili rezultate predstavljene v Preglednici 9.

Preglednica 9. Priprava standardne raztopine kurkumina

Koncentracija(g/L)	A (pri 422.3 nm)
0,0010	0,26
0,0025	0,60
0,0050	1,10
0,0100	2,07
0,0150	2,98

⁷ Uporabili smo čisti kurkumin proizvajalca Sigma- Aldrich.

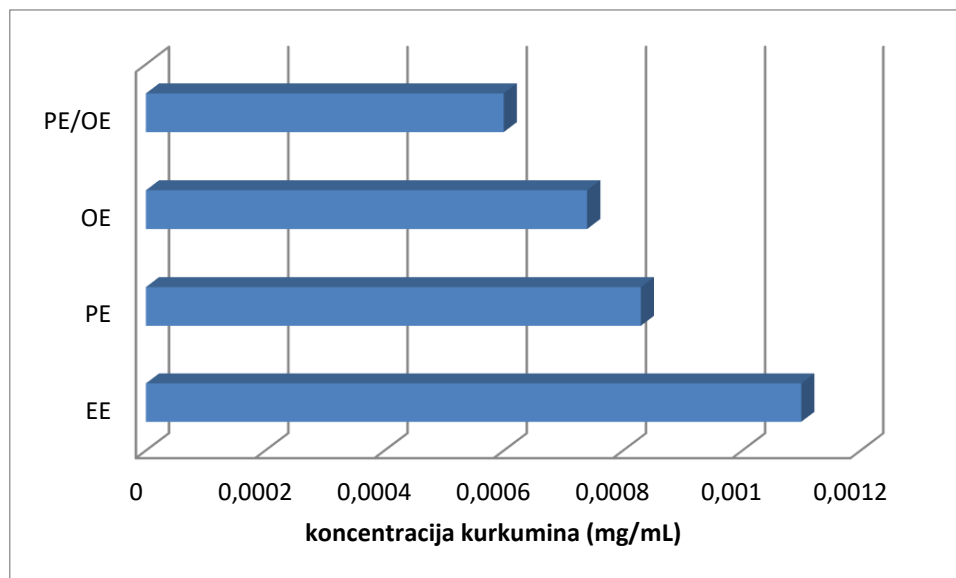


Graf 6 - Umeritvena premica za izračun koncentracije kurkumina v ekstraktih

Vse raztopine ekstraktov smo pripravili tako, da smo vzeli 0.1000 g ($\pm 0,0001$) vsakega vzorca in ga raztopili v 100 mL etanola. Nato smo pri val. dolžini 422,3 nm vsem vzorcem izmerili absorbanco in jim s pomočjo enačbe umeritvene premice: $y = 2014x$, izračunali koncentracijo kurkumina (preglednica 10).

Preglednica 10 - koncentracija kurkumina v ekstraktih kurkume

Vzorec	A (pri 425.7 nm)	Koncentracija kurkumina v ekstraktu (g/ L)
EE	2,189	$1,1 \times 10^{-3}$
PE	1,673	$8,3 \times 10^{-4}$
OE	1,499	$7,4 \times 10^{-4}$
PE/OE	1,215	$6,0 \times 10^{-4}$



Graf 7 - Koncentracija kurkumina v različnih ekstraktih

5 RAZPRAVA

V prvem del raziskovalne naloge smo določili topilo, ki je glede na topnost kurkume pri sobni temperaturi, najbolj ustrezno za ekstrakcijo kurkumina, kar je bil eden od ciljev 1. dela te raziskave. S pomočjo UV-VIS spektroskopije smo kot najustreznejšo topilo izbrali etanol. V literaturi lahko zasledimo, da so do podobnih rezultatov prišli tudi drugi avtorji (Pawar s sod. (2014), Lee s sod. (2013), Shiyou s sod. (2011), vendar mnenja glede tega niso enotna. Kulkarni s sod. (2012) navaja metanol kot ustreznejše topilo, Nabati s sod. (2014) ekstrakcijo začneja s heksanom (tri dni intenzivnega mešanja), ki mu sledi ekstrakcija z metanolom in nato preko kislinsko baznih lastnosti kurkumina izolacija z obarjanjem. Izkoristke ekstrakcije je zato med seboj težko primerjati. K temu pripomore tudi dejstvo, da je kurkuma pridobljena iz naravnega vira, kar pomeni, da je tudi kakovost rastline, način nabiranja in gojenja, bistveno pripomogel h količini kurkumina, ki ga lahko ekstrahiramo.

Ekstrakcija na klasičen način (uporaba Soxhletovega aparata) je dala 2,35% izkoristek. Če to primerjamo z avtorji, ki so kot topilo izbrali etanol, je to le nekoliko manj kot omenjajo v svojih delih Funk s sod. (2006), Desphande s sod. (1997) in Azuine s sod. (1994). Izkoristki, ki jih navajajo ti avtorji se gibljejo med 2,86 in 5,69%.

Predvidevamo, da bi s podaljšanjem časa ekstrakcije na vsaj 12 h lahko izkoristek ekstrakcije dvignili tudi v našem primeru⁸, saj vsi zgoraj navedeni avtorji omenjajo, da so ekstrakcije potekale od 12 – 24h.

Vsebnost kurkumina v ekstraktu je bila $1,1 \times 10^{-3}$ g/L.

Ekstrakcija z vodno paro je dala na videz boljše rezultate, saj je izkoristek 3,22%, vendar UV-VIS določitev koncentracije kurkumina v ekstraktih pokazala precej nižje vrednosti; od $7,4 - 8,3 \times 10^{-4}$ g/L. Problem te ekstrakcije je, da skozi filter, ki bi moral zadržati delce kurkume, le-te dejansko ne zadrži povsem in zato je v končni masi ekstrakta verjetno tudi določen del mase kurkume in ne (samo) kurkumin, zelo težko pa je tudi povsem odstraniti vodo.

Če preračunamo kolikšna je dejanska masa kurkumina v 15 g kurkume (masa vzorca) v pridobljenih ekstraktih dobimo podatke predstavljene v Preglednici 11.

Preglednica 11 - Masa kurkumina v posameznih ekstraktih

Vzorec	Koncentracija kurkumina v ekstraktu (g/ L)	Masa kurkumina (mg) v 0,1 g ekstrakta	Masa kurkumina v celotnem ekstraktu (15, 0g kurkume), mg	Masni delež kurkumina v ekstraktih (%)
EE	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-4}$ (0,11 mg)	0,385	2,57
PE	$8,3 \times 10^{-4}$	$8,3 \times 10^{-5}$ (0,083 mg)	0,315	2,10
OE	$7,4 \times 10^{-4}$	$7,4 \times 10^{-5}$ (0,074 mg)	0,281	1,87

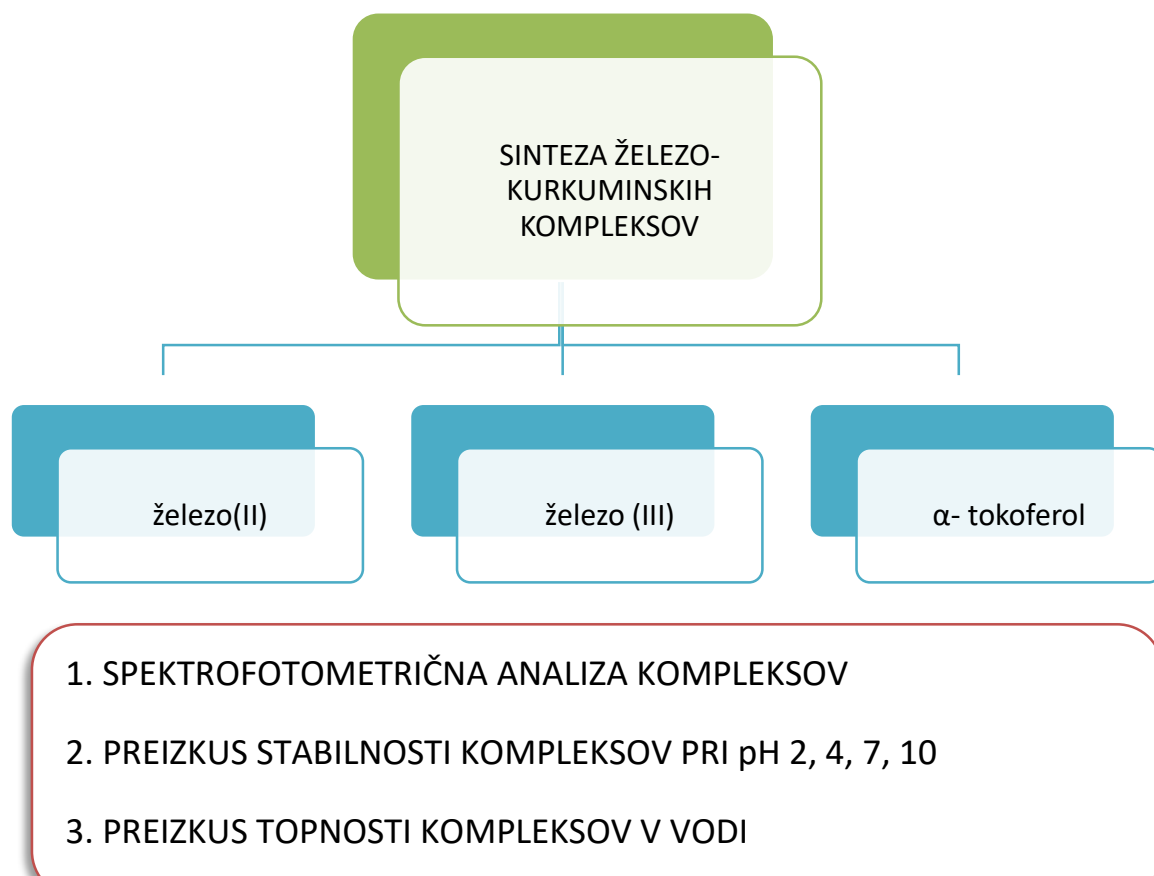
V etanolnem ekstraktu smo uspeli pridobiti 0,390 mg čistega kurkumina in v vodnem skupaj $\approx 0,600$ mg pri čemer je ta rezultat pod vprašajem zaradi načina ekstrakcije. Preračunamo v masne odstotke to pomeni, da je kurkuma, ki smo jo uporabili vsebovala \approx **2,5% kurkumina (etanolni ekstrakt) oz. 4% ekstrakt z vodno paro**. Pawar s sod. (2014), ki je med seboj primerjal štiri različne indijske kurkume navaja, da se vsebnost kurkumina v njih giblje med 2,85% do 4,32% (odvisno od geografskega porekla in načina pridelave). Alschulerjeva (2016) v svojem preglednem članku navaja, da se vrednosti kurkuminoidov v kurkumi giblje med 2% do 5%, pri čemer 85% celotne mase predstavlja kurkumin. V lahko hlapnih oljih naj bi prevladovali seskviterpeni, poleg ogljikovih hidratov ter proteinov in vlaknin. Taylor s sod. (1992) poroča, da je se vsebnost kurkumina v kurkumi lahko giblje od 2,8% do 10.9%.

⁸ V šol. laboratoriju, ki je edini prostor za izvedbo rednih šol. vaj, je bilo skoraj 8h ekstrakcije maksimalen čas, ki ga bilo še mogoče izpeljati v enem ciklu (opomba avtorice).

Kurkuma, ki se prideluje za široko potrošnjo, je v njihovi raziskavi, ki je zajela 66 lokacij, vsebovala od 0,58% do 3,14% kurkumina. Na tej osnovi sklepamo, da so dobljeni rezultati zadovoljivi in v okvirjih do sedaj opravljenih raziskav, čeprav so realno verjetno nižji, saj ekstraktom pridobljenim z vodno paro nismo uspeli povsem odstraniti vode (dokaz IR spektri).

Tankoplastna kromatografija je potrdila, da je v pridobljenih ekstraktih kurkumin, ATR-FTIR spektroskopija je to delno potrdila za alkoholni ekstrakt. Na osnovi dobljenih rezultatov ter podatkov iz literature zaključujemo, da je indijska kurkuma, ki je dostopna na slovenskem trgu, in bila vzorec v tej raziskavi, solidne kvalitete (z vidika vsebnosti kurkumina) ter je zato lahko dober vir aktivne snovi, ki je bila predmet raziskovanja v drugem delu naloge, to je strukturne modifikacije kurkumina v smeri njegove večje bio-dostopnosti.

6 RAZISKAVA – 2. DEL – SINTEZA KOMPLEKSOV KURKUMINA Z ŽELEZOM



Organigram 2 - shematični prikaz 2. dela raziskave

6.1 IZVEDBA PRAKTIČNEGA DELA

Pripravili smo si:

- a) 50 mL 0,5 mmol/L Fe (II) in Fe (III). Vir železa: $\text{Fe}(\text{NO})_3$ in $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Zagreb, p.s).
Raztopine so bile pripravljene kot etanolni ekstrakti.
- b) 50 mL 1,0 mmol/L kurkumina v etanolu (hladni!)
- c) 25mL 1,0 mmol/L vsakega ekstrakta kurkumina v etanolu (hladni!)
- d) A-tokoferol (Merck Aldirch; 95,5%)

Najprej smo si deset 50 mL čaš označili s števkami od 1-10 (glej preglednico 12) in nato smo v vsako čašo dali najprej raztopino kurkumina in zatem dodali še ustrezno železovo sol. Čaše smo za 30 min položili v vodno kopel (60°C), občasno premešali in nato ohladili na sobno temperaturo. Po 24 urah je sledila analiza produktov (glej preglednico 13).

Preglednica 12 - Načrt poskusa

poskus	V(ČK), ml (±0,05)	V(EE), ml (±0,05)	V(PE), ml (±0,05)	V(OE), mL * ⁹ (±0,05)	V(Fe(II) , ml(±0,05)	V(Fe(III) , ml(±0,05)	V(α-tokoferol), ml, (±0,05)
1	5,0	-	-	-	5,0	-	-
2	5,0	-	-	-	-	5,0	-
3	5,0	-	-	-	5,0	-	1,0
4	5,0	-	-	-	-	5,0	1,0
5	-	5,0	-	-	5,0	-	-
6	-	5,0	-	-	-	5,0	-
7	-	-	5,0	-	5,0	-	-
8	-	-	5,0	-	-	5,0	-
9	-	-	-	5,0	5,0	-	-
10	-	-	-	5,0	-	5,0	-

⁹ * opomba. Z oljnim ekstraktom nam ni uspelo pripraviti raztopin z znano koncentracijo, saj je poskus pridobivanja kurkumina v trdnem stanju ni bil uspešen (celotna odstranitev topila). Ker delo z oljnim ekstraktom v katerem je še vedno bila prisotna voda ne bi bilo kvantitativno natančno, serije poskusov 9 in 10 nismo izvedli.

Legenda: ČK – čisti kurkumin EE – etanolni ekstrakt PE – ekstrakt pridobljen v vodno paro OE – oljni ekstrakt pridobljen z vodno paro

α -tokoferol (Sigma Aldrich) je izjemno viskozna tekočina, zato je njeno natančno odmerjanje zelo težavno. To je bil glavni razlog, da smo poskuse z njim izvedli samo v primeru čistega kurkumina.

6.2 REZULTATI

6.2.1 Masa kompleksov železa in kurkumina

Kvalitativna opažanja

Ob dodatku Fe soli se je oranžna raztopina kurkumina spremenila v temno rdečo – rjavo. Raztopina je izgubila transparentnost. Nastala je oborina zelo fino dispergiranih trdnih delcev, ki so lebdeli v tekočini, zato smo za filtriranje uporabil najgostejši (kvantitativni filter papir (Whatman)). Ker smo imeli zelo majhne mase produktov, se za filtracijo pod znižanim tlakom nismo odločili, saj bi lahko del mase produktov izgubili že med prenosom filter papirjev iz Büchnerjevega lija na urno steklo.

Da bi lahko izračunali izkoristek (maso kompleksa) smo na analitski tehtnici (Kern AAA2015) zelo natančno stehali maso filter papirja. Ko smo oborino odfiltrirali, in filter papir posušili na zraku, smo ga ponovno stehali. Razliko v masi je predstavljal kompleks kurkumina in železa (Preglednica 13).

Preglednica 13 - Masa kompleksa kurkumina in železa in z α -tokoferolom)

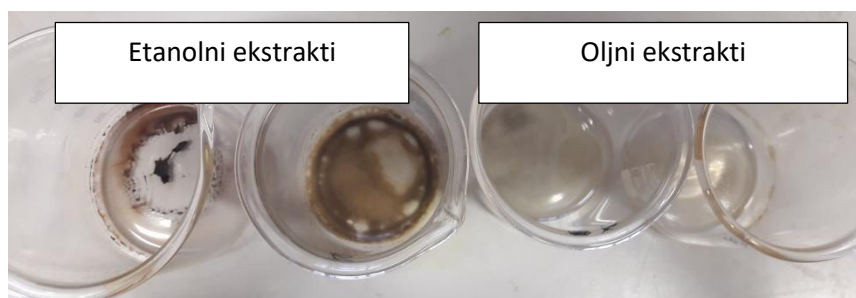
poskus	Masa filter papirja (g), $\pm 0,0001$ g	Masa filter papirja (g) + kompleksa, $\pm 0,0001$ g	Izračunan način vezave (kurkumin: Fe)
1	1.0094	1.1059	2:1
2	1.1060	1.1147	1:1
3*	1.0894	1.1439	1:1
4*	1.09214	1.1576	1:1
5	1.0870	1.0923	1:1
6	1.0888	1.1731	2:1
7	1.1144	1.1308	1:1
8	1.0872	1.0931	1:1



Slika 26 - Primer kompleksa čistega kurkumina z Fe(II) in α -tokoferolom po filtraciji (levo) in kristali kurkumina z Fe(II) desno

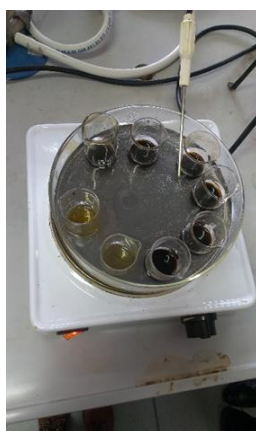
Produkti – kompleksi čistega kurkumina z Fe(II) so nekoliko svetlejše barve kot kompleksi Fe(III). Kompleksi, kjer je bil dodan α -tokoferol so homogeni vendar samo, če dodamo železove (II) ione. Kompleksi nimajo izrazitega vonja in s časom na zraku ne spreminjajo barve. Njihova topnost in stabilnost je bila preučevana v nadaljevanju.

Precej drugačen videz so imeli kompleksi ekstraktov kurkumina in železovih ionov. Po odstranitvi topila smo opazili, da je pri etanolnem ekstraktu nastala rjava trdna snov, ki pa po izgledu ni homogena (Slika 27). Pri oljnem ekstraktu je produkt svetlo rumene barve, vendar tekstura homogena.



Slika 27- kompleksi železa po odstranitvi topila z železovimi ioni

Na osnov teh rezultatov smo se odločili, da topnost in vpliv pH na komplekse kurkumina v nadaljevanju preučujemo le s kompleksi čistega kurkumina (1-4).



Slika 28 – vodna kopel z vsemi vzorci

6.2.2 Izračun izkoristka

Preglednica 14 – Predvideno razmerje vezave kurkumin - železo

poskus	Masa produkta	Izkoristek sinteze (%)
1	0.0965g	63,5
2	0.0087g	5,7
3	0.0545g	35,9
4	0.0655g	43,2
5	0.0053g	3,5
6	0.0843	55,5
7	0.0164g	10,8
8	0.0059g	3,9

* v primeru tokoferola smo pri molski masi upoštevali 1 mol kurkumina in 1 mol α -tokoferola ($M=430.71$ g/mol)). Predvidevali smo razmerje vezave 1:1.

$$n(\text{kurkume}) = \frac{0.0127\text{g/mol}}{368.38\text{g}} = 3.44 \times 10^{-5} \text{ mol}$$

$$n(\text{Fe}^{2+}) = \frac{0.0475\text{g/mol}}{278.02\text{g}} = 1.71 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

Primer izračuna za razmerje kurkumin : (Fe (II) ali Fe (III))= 1:1

$$\frac{n(\text{kurkumin})}{n(\text{Fe})} = \frac{1}{1}$$

$$M(\text{komplesa}) = 424.24 \text{ g/mol}$$

$$\Delta m = 0.0965\text{g}$$

$$n = \frac{\Delta m}{M} = 2.27 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

$$n(\text{praktično}) = 2.27 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

Primer izračuna za razmerje kurkumin : (Fe (II) ali Fe (III)) = 1:2

$$\frac{n(\text{kurkumin})}{n(\text{Fe})} = \frac{1}{1}$$

$$M(\text{kompleksa}) = 792.349 \text{ g/mol}$$

$$\Delta m = 0.0956 \text{ g}$$

$$n = \frac{\Delta m}{M} = 1.22 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

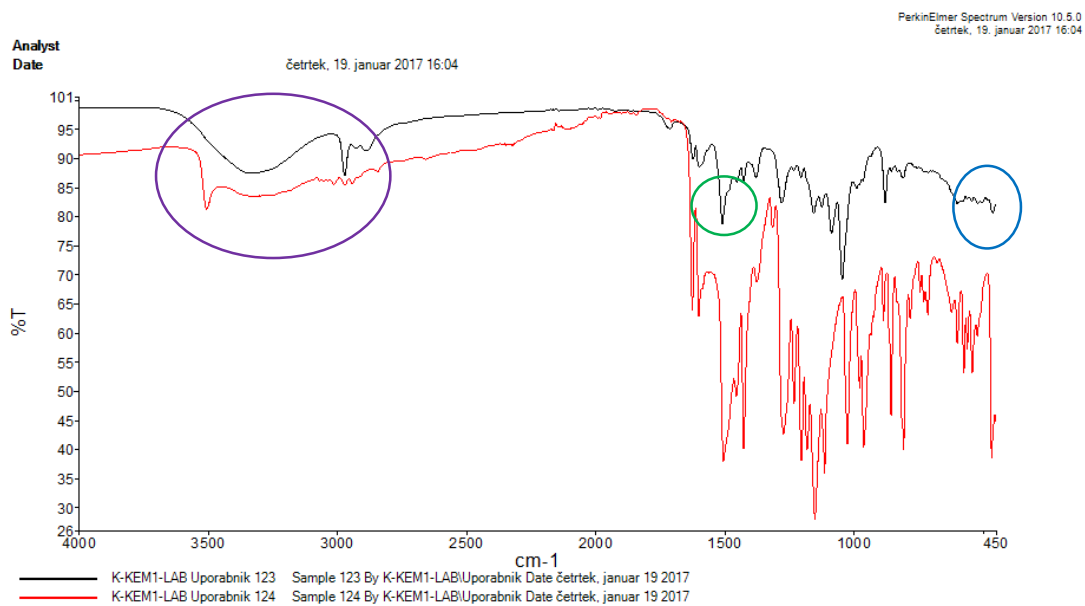
$$n(\text{praktično}) = 1.22 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

7.3 SPEKTRALNE ANALIZE PRODUKTOV

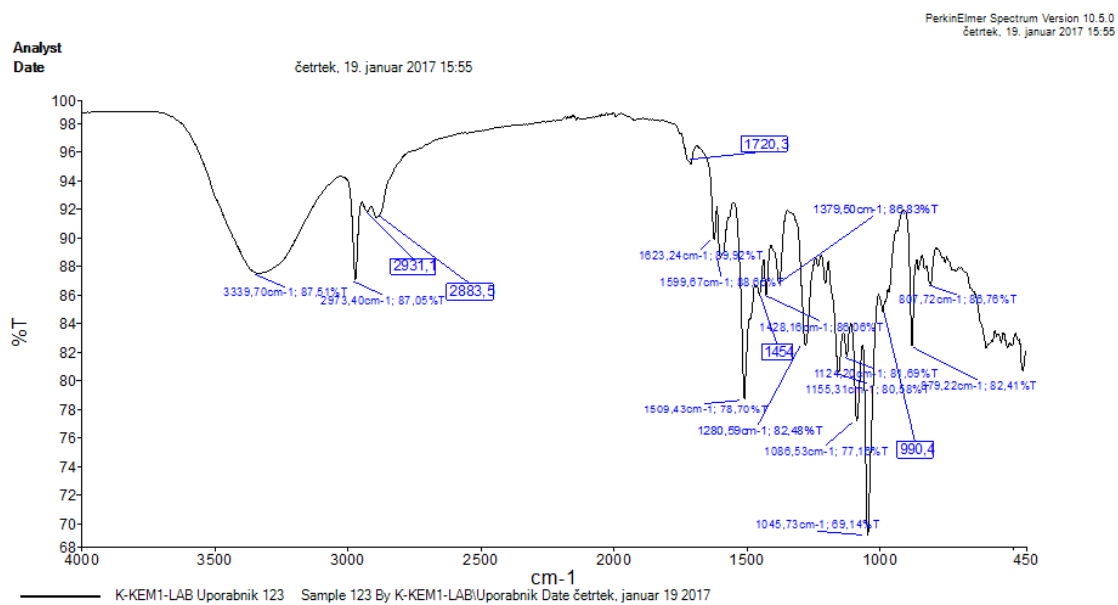
7.3.1 ATR-FTIR analiza

Vezava kovinskega iona je v kurkuminu je bila predvidena za enolni del oz. keto del molekule kurkumina, medtem ko naj bi metoksi skupine ostale neprizadete. To pomeni, da smo v ATR-FTIR spektrih opazovali predvsem območje med 3500 to 2800 cm^{-1} , kjer so značilne vibracije za $-OH$, $-CH$ (aromatski obroč) in $-CH$ (alkilni del) vibracije okoli 1628 cm^{-1} , ki je značilna za $C=O$ skupino. V primeru uspešne tvorbe kompleksov smo pričakovali, da se vrh za $C=O$ pomakne k nižjim valovnim številom, saj se je na to mesto vezalo železo. Zmanjšati pa se mora tudi vrh, ki pripada absorbanci zaradi OH skupin. Priyadarsini (2014) omenja, da imajo kompleksi kurkumina s kovinskimi ioni značilne vibracije $C-M$ (ogljik-kovina) vezi od 455 cm^{-1} do 650 cm^{-1} .

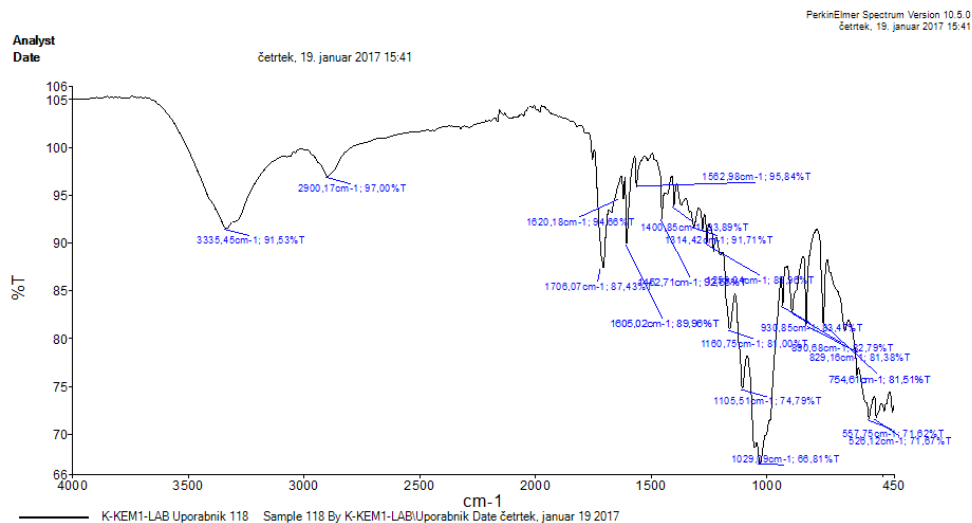
Kot vidimo iz slike 29 se ATR-FTIR spektri v omenjenih delih res razlikujejo. Oster vrh pri 3508 cm^{-1} se je zmanjšal in razpotegnil proti vibracijam, ki so značilne za $C-H$ vezi (označeno vijolično). Kompleks kaže simetričen in širok pas pri 3448 cm^{-1} of $O-H$ kar bi lahko nakazovalo tudi možnost sinteze simetrične strukture. Vrh za $C=O$ se je premaknil iz 1506 cm^{-1} na 1510 cm^{-1} (označeno zeleno), prav tako pa spekter povsem drugačen v predelu od 455 cm^{-1} do 650 cm^{-1} (označeno modro).



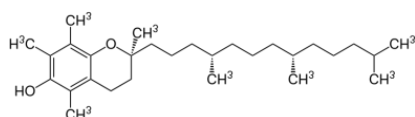
Slika 29 – Primerjava spektra čistega kurkumina (rdeča krivulja) in kurkumina z Fe(II) ioni (črna krivulja)



Slika 30 - Spekter kompleksa kurkumina z Fe(II).



Slika 31 – spekter kurkumina z Fe(II) in α -tokoferolom

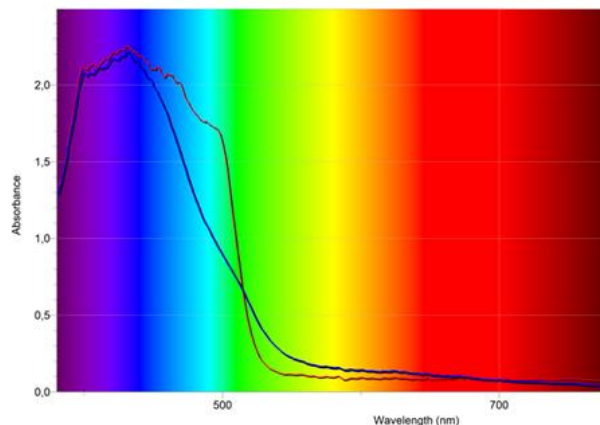


Slika 32 – strukturna formula α -tokoferola

Kot vidimo iz slike 31 se ATR-FTIR spekter kurkumina, Fe(II) α -tokoferola razlikuje od kompleksa v katerem je le železo. Tudi tukaj ostrega vrha pri 3508 cm⁻¹ ne vidimo, ampak razpotegnjen vrh okoli 3354 cm⁻¹ in jasno viden vrh pri 2900 cm⁻¹, ki ga pripisujemo C-H vezem v alkilnem delu tokoferolove molekule. Vrh za C=O (kurkumin) se je premaknil iz 1506 cm⁻¹ na 1563 cm⁻¹ iz česar sklepamo, da se je železo vezalo, vendar je struktura kompleksa drugačna. Spekter se signifikantno razlikuje tudi v predelu od 455 cm⁻¹ do 650 cm⁻¹, iz česar sklepamo, da je sinteza uspela.

7.3.2 UV- VIS spektroskopija

Čisti kurkumin ima maksimalno absorbanco pri valovni dolžini 422,3 nm.

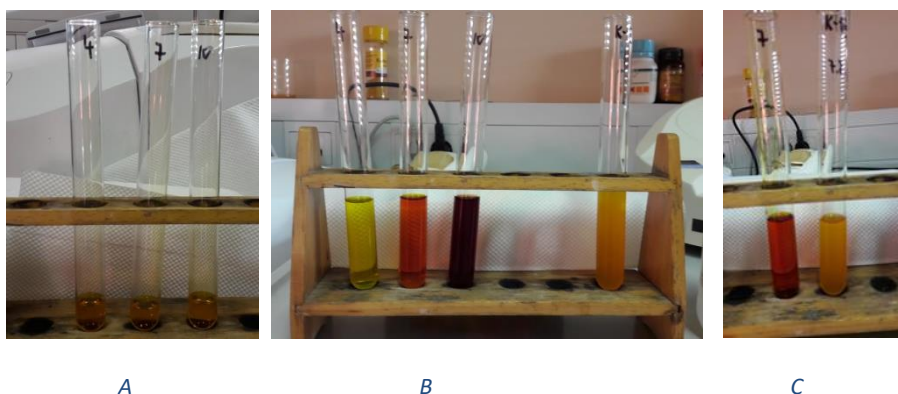


Slika 33 – UV-VIS spekter čistega kurkumina (modro) in primerjava s kompleksom (rdeče)

UV-VIS spektri pridobljeni za komplekse kažejo več vrhov v vidnem delu EMV, opazimo pa tudi premik k višjim energijam zaradi π - π^* prehodov. Če predpostavimo vključitev karbonilne skupine kurkumina v kompleks so cepljene vrhovi lahko dokaz, da je sinteza uspela.¹⁰

7.4 STABILNOST KELATOV ŽELEZA PRI RAZLIČNIH VREDNOSTIH pH

Za analizo občutljivosti na različne vrednosti pH smo ekstrakte, čisti kurkumin in kelate izpostavili različnim vrednostim pH: 4, 7, 10 in za kelat železa še pH 7,2. Uporabili smo puferne raztopine (Itrij). Rezultati so prikazani na sliki 34.



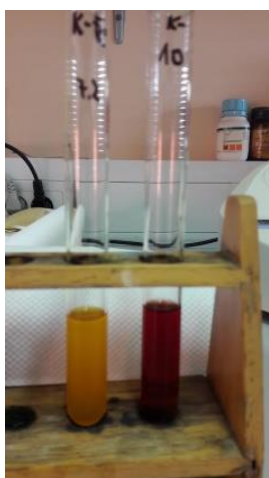
Slika 34 A,C - A) etanolna raztopina kurkumina pred dodatkom pufov. B)- etanolna raztopina kurkumina v pufru pH 4, 7 in 10 (od leve proti desni) ter železov kelat kurkumina pri pH 7,2 (skrajno desno); C)- primerjava med stabilnostjo čistega kurkumina (levo) in kelata kurkumina pri pH 7.2 (desno)

¹⁰ Spektri bi bili lepši, če bi uporabili nekoliko nižje koncentracije snovi (opomb aavtorice).

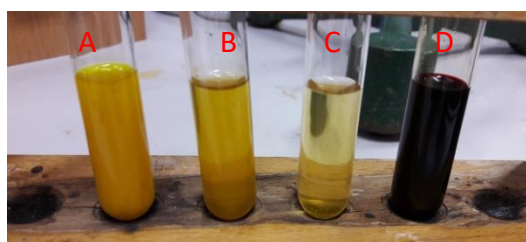
Kot vidimo iz slike v 34B je kurkumin pri pH 7 že nestabilen (sprememba barve iz rumene v rdečo in nato v temno rdeče – rjavo) in razpada v anilin, vanilnsko kislino, ferulsko kislino, aceton in druge razpadne produkte. Razpad v močno bazičnem mediju se zgodi takoj.

Kompleks kurkumin-železo (II ali III) je pri pH 7,2 (simulacija pH v tankem črevesju) obstojen (slika 34 C). Tudi v zelo alkalnem mediju so kompleksi kurkumina z Fe (II) in Fe (III) precej stabilnejši kot čistega kurkumina, kar vidimo iz slike 35. Kompleks je ohranil rumeno barvo, vendar etanolni ekstrakt v puferni (vodni) tekočini ni bil dobro topen.

Stabilnost kompleksa kurkumin-železo (II ali III) je bila opazno večja tudi pH 10, kar vidimo iz slike 35 .



Slika 35 - Primerjava med stabilnostjo čistega kurkumina in kompleksa kurkumin-železo pri pH 10



Slika 36 – (od leve proti desni) A- kurkumin v pufru s pH 3,7; B- kompleks kurkumina in Fe(II) v pufru s pH 3,7; C- kompleks kurkumina in Fe(II) v pufru s pH 10,0 ; D - čisti kurkumina in Fe(II) v pufru s pH 10,0.

Kompleks Kurkumin – Fe(II) ali kurkumin – Fe(III) je bil obstojen tudi pri pH 3,7.

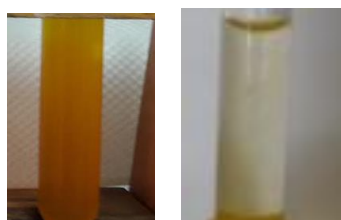
Pridobili smo majhne količine kompleksov železa s kurkuminom.

7.4.1 Obstočnost kompleksov v odvisnosti od valence železa

V raziskavi nismo opazili nobenih razlik v topnosti kompleksov v odvisnosti od valence železovega atoma.

7.5 TOPNOST KOMPLEKSOV KURKUMINA Z ŽELEZOVIMI IONI V VODI

Če primerjamo topnost kurkumina v deionizirani vodi pri pH 7 in kompleksa z železom(II) pri pH 7 opazimo razliko (Slika 37), opazimo v, da v primeru kompleksa dobimo rumeno obarvano raztopino, ki ni razpadala dalje; v primeru čistega kurkumina pa najprej opazimo delce, raztopina je nestabilna in v prej kot v 30 min razpade.

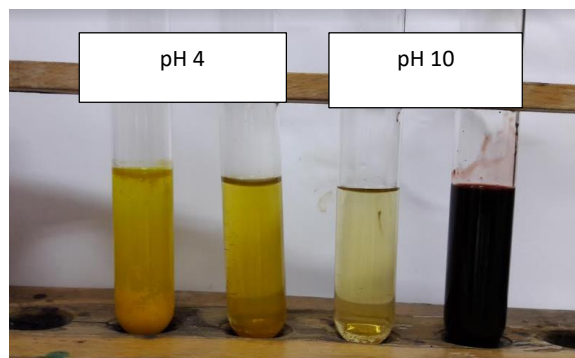


A)

B)

Slika 37 A) - Topnost kompleksa kurkumin- železo(II) (0,05g /100 ml) in B) – topnost čistega kurkumina(0,05g kurkume/100 mL)

Pri kompleksih z železom je bila topnost bistveno boljše, kar se vidi iz slike 36.



Slika 38 – Topnost in stabilnost kompleksov kurkumina z Fe(II) v vodi primerjavi s čistim kurkuminom pri pH 3,7 in pH 10.

Na sliki 36 opazimo, da je topnost čistega kurkumina v deionizirani vodi pri pH 3,7 zelo slaba (usedanje na dno epruvete). Kompleks z železom je zraven in je mnogo bolj topen. Še bolj smo bili presenečeni nad rezultatom v bazičnem delu pH. Kompleks kurkumina z Fe (3. epruveta od leve proti desni) je ostal transparenten, medtem, ko je čisti kurkumin takoj razpadel.

7.6 RAZPRAVA

Kurkumin je v vodi zelo slabo topen. Njegova topnost se povečuje v polarnih aprotičnih topilih (Khopode s sod. (2000)), kar smo v nalogi potrdili, vendar je bil naš cilj pretvoriti kurkumin v obliko, ki bo v vodi bolj topna, istočasno pa ne bo prehitro hidrolizirala. Za bio-medicinske aplikacije je topnost v vodi bistvenega pomena. Ker je kurkumin že v rahlo alkalnem mediju zelo nestabilen in razpada v vanilin in njegov kislinski derivat ter številne druge razgradljive produkte (npr. aceton), ki ne kažejo več antioksidacijskih, protivnetnih, antikarcinogenih in drugih pozitivnih učinkov kurkumina, je nujno, da ga pri vnosu v telo pretvorimo v obliko, kjer bo manj podvržen solvolizi (hidrolizi) in razgradnji.

V prvem delu naloge smo kurkumin izolirali iz kurkume na dva načina: z uporabo Soxhletovega aparata in organskim topilom etanolom ter parno destilacijo. Izkoristki ekstrakcij so bili v okviru velikostnih razredov, ki jih navaja večina raziskovalcev, to je 2,35% pri uporabi etanola kot topila (Soxhletov aparat) in 3,22% pri parni ekstrakciji. Določitev koncentracije kurkumina preko umeritvene premice s čistim kurkuminom, je pokazala, da je bil delež kurkumina v ekstraktih pridobljenih s parno destilacijo nižji (velikostni razred $\approx 7,5 \times 10^{-4}$ g/L) kot v etanolnem ekstraktu ($1,1 \times 10^{-3}$ g/l), kar pomeni, da so vodni ekstrakti predstavljali mešanico različnih spojin in je bil delež kurkumina manjši od kot pri etanolnih ekstraktih. Menimo, da je bil glavni problem v načinu izvedbe ekstrakcije ter dolžini trajanja ekstrakcije. Način, kot smo ga izvedli je dopuščal, da so skozi filter aparature uhajali delce kurkume, prav tako nam iz ekstraktov ni uspelo v celoti odstraniti vode. TLC analiza ekstraktov je potrdila, da imamo v ekstraktih kurkumin, vendar smo preko ATR-FTIR spektrov prišli do zaključka, da to ni čisti kurkumin. Te meritve lahko moti tudi že najmanjša prisotnost topila. S čistim kurkuminom in etanolnimi ekstrakti smo nadaljevali drugi raziskave, katere namen je bil sintetizirati komplekse kurkumina z železovimi ioni in sicer Fe(II) in Fe (III) ioni.

Sinteza kompleksa kurkumina z železovimi ioni je uspela. Takoj ob dodatku Fe(II) ali Fe (III) ionov nastanejo temno rdeče-rjav obarvani kompleks (pH je v raztopini je bil $\approx 6,5$). Kompleksi kurkumina z Fe(II) so nekoliko svetlejša barve kot kompleksi Fe(III). Kompleksi, kjer je bil dodan α -tokoferol so najbolj transparentni in svetli ter homogeni, vendar samo, če dodamo železove (II) ione. Kompleksi nimajo izrazitega vonja in s časom na zraku ne spreminjajo barve. Pričakovano je bilo, da bodo najvišji izkoristki sintez pri čistem kurkuminu. Na osnovi rezultatov (preglednica 14) lahko zaključimo, da je Fe(II) bolj primerno za sintezo kompleksov, saj smo v primerih njegove uporabe dobili najvišje izkoristke (65,5%). Ta odstotek je pri vezavi Fe(II)-kurkumin-tokoferol nižji (35,5%). Preprost izračun množinskih razmerij kaže, da je v prvem primeru mnogo verjetnejša vezava kurkumin: Fe= 2:1; visok izkoristek bi

lahko pripisali tudi temu dejstvu. Podobno sklepamo za primer etanolnega ekstrakta in Fe(III), ki je drugi najvišji izkoristek in sicer 55,5%. V celoti smo dobili najslabše izkoristke pri ekstraktih parne destilacije – med 3,9- 10,8%.

Predvidevali smo, da je kurkumin v etanolu prisoten v keto-enolni obliki, kar pomeni, da bi vezava železovih ionov lahko bila v razmerju 1:1 ali morda 1:2. Ostale vezave so manj verjetne, saj v polarnih protičnih topilih (etanol) enolna tautomera zasede odprto *trans*-konformacijo in enolni proton lahko s karbonilno skupino tvori vodikovo vez. Slednje je zelo pomembno v fizioloških pogojih, kjer lahko takšna odprta enolna tautomera reagira z vodnimi molekulami v plazmi, citoplazmi, amino skupinami in drugimi biološkimi molekulami. Kompleksi železa so v zelo kislem okolju (želodčna kislina) praviloma dobro topni, zato predvidevamo, da bi lahko pri oralnem jemanju takšnih kompleksov prišlo do delne hidrolize in sproščanja kurkumina, vendar bi sluznico črevesja dosegla precej višja koncentracija kurkumina, kot brez kompleksiranja z železom in se zaradi večje topnosti tudi lažje absorbirala.

Računski pristop kaže, da je večja verjetnost, da so nastali kompleksi kurkumin - železo nastali pretežno v razmerju 1:1.

ATR-FTIR spektri čistega kurkumina in njegovih železovih kompleksov se razlikujejo. Oster vrh pri 3508 cm^{-1} se je zmanjšal in razpotegnil proti vibracijam, ki so značilne za C-H vezi (označeno vijolično). Kompleks kaže simetričen in širok pas pri 3340 cm^{-1} (O-H vibracije) kar bi lahko pomenilo sintezo simetrične strukture. Vrh za C=O se je premaknil iz 1506 cm^{-1} na 1510 cm^{-1} (značilnost kurkuminih kompleksov), prav tako pa spekter povsem drugačen v predelu od 455 cm^{-1} do 650 cm^{-1} , kar nakazuje nastanek nove vezi s kovino.

Pri preučevanju lastnosti kompleksov kurkumin-železo (II ali III) smo ugotovili, da so pri pH 7,2 še vedno obstojni, bistveno bolj obstojni od čistega kurkumina so pri pH 10. Kompleks ohrani rumeno barvo, čeprav je v vodi boljše topen kot čisti kurkumin. Tudi pri pH vrednostih nižjih od 7 kelati kažejo stabilnost in boljšo topnost v primerjavi s čistim kurkuminom (npr. pH 10).

Kompleksi kurkumina z Fe(II) in Fe(III) se med seboj razlikujejo v intenziteti barve, ne pa tudi v topnosti in stabilnosti. Pri dodatku tokoferola se kristalinična struktura izgubi in produkt predstavlja pol-trdna svetlo rjava snov. Poskusi tvorbe kompleksov z ekstrakti so bili manj uspešni, saj nismo dobili homogene trdne snovi. Razlog so nečisti ekstrakti, zato bi v prihodnje bilo potrebno vse ekstrakte pred nadaljnjo uporabo prečistiti (npr. s kolonsko kromatografijo). Pri ponovitvi poskusov bi poskus ponovili z

večjimi količinami reagentov, ker bi bilo delo pri karakterizaciji produktov in njihovih lastnosti lažje in bolj natančno.

Na osnovi rezultatov poskusov lahko zaključimo, da je ekstrakcija kurkumina v lab. pogojih šolskega laboratorija z uporabo Soxhletovega aparata ali z uporabno parne destilacije lahko uspešna, vendar na ta način ne moremo pridobiti ekstraktov visoke čistoče. Izkoristki so zato precej slabši, kot kažejo izračuni ($\approx 2,5 - 4,0\%$). Sinteza kurkuminovih kompleksov z železom, ki je bila izvedena z namenom povečanja topnosti kurkumina v vodnih raztopinah ter nizko alkalnih okoljih (npr. tankem črevesju), je bila uspešna. Izkoristki sinteze so pri čistem kurkuminu najvišji in sicer $63,5\%$.

ATR-FTIR spektroskopija je potrdila uspešnost sinteze, prav tako poskusi s katerimi smo preučili lastnosti pridobljenih kompleksov (topnost v raztopinah pufrov) in obstojnost na bazične medije.

8 ZAKLJUČKI

S poskusi smo potrdili hipotezo hipoteza 1 in sicer ekstrakcija kurkumina iz kurkume je mogoča tako z organskimi topili kot z vodno paro, čeprav je kurkumin v vodi zelo slabo topna snov. Ekstrakt pridobljen v organskih topilih je imel manjši izkoristek ($2,35\%$) kot ekstrakt pridobljen z vodno paro ($2,55\%$) vendar približno 5x večjo vsebnost kurkumina – $1,1 \times 10^{-3}$ g/L.

Tudi hipoteza 2 je bila potrjena. Železovi ioni so tvorili komplekse s kurkuminom v ali brez prisotnosti α -tokoferola, saj je zaradi keto-enolnega dela kurkumina le-ta izjemno primeren ligand za vezavo na železove ione. Večina množinskih razmerjih kompleksov je kurkumin : železo 1:1. Najvišji izkoristek smo dobili pri uporabi čistega kurkumina in Fe(II) in sicer $63,5\%$. Najmanjši izkoristek je dal i ekstrakt parne destilacije in sicer $3,9\%$.

Hipoteza 3 je bila delno potrjena. Na tvorbo kompleksov bistveno vpliva koncentracija kurkumina oziroma njegova čistoča. Največji izkoristek smo dobili pri čistem kurkuminu in mnogo manjše pri ekstraktih s parno destilacijo, vendar tega nismo dokazali za vse ekstrakte, saj smo pridobili zelo majhne mase ekstraktov in poskusa z oljnimi ekstrakti parne destilacije nismo izvedli.

Delno je bila potrjena tudi hipoteza 4 in sicer, da valenca železovih ionov Fe (II) ali Fe(III) ne vpliva na nastanek kompleksov kurkumina. Rezultati kažejo, da je Fe(II) bolj primerno za tvorbo stabilnih kompleksov s kurkuminom, vendar vpliva oksidacijskega števila na topnost kompleksov nismo dokazali.

Potrdili smo hipotezo 5 in sicer kompleksi kurkumina z Fe (II) in Fe (III) so v vodi boljše topni kot čisti kurkumin in tudi precej stabilnejši v alkalnem mediju.

ATR –FTIR spektroskopija in UV-VIS spektroskopija sta bili metodi s katerimi smo lahko potrdili nastanek kompleksov kurkumina z železom in sta primerni metodi za raziskave kompleksov kurkumina s kovinskimi ion, zato je s tem bila potrjena tudi hipoteza 6.

Kompleksi kurkumina in železa imajo svojstvene lastnosti. V nadaljevanju bi lahko preučevali njihove antioksidativne lastnosti, zanimiva pa bi bila tudi raziskava, ki bi vključevala žive organizme .

9 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Pri raziskovalnem delu se pogosto srečujemo z moralnimi dilemami, ki vključujejo tako področje varovanja okolja kot trajnostni vidik raziskovalnega dela. S poglobljenim pristopom, na ravni, ki jo trenutno zmorem, sem poskušala v eksperimentalnem smislu uporabljati čim manjše količine kemikalij in organskih topil. Organska topila smo z destilacijo oz. uporabo rotavaporja, odhlapeli na varen način in jih lahko ponovno uporabimo, ter s tem zmanjšamo negativen vpliv na okolje, ki bi ga z njihovo uporabo lahko naredili. Naloga je usmerjena aplikativno in želi trenutno manj dostopno, narediti bolj dostopno in v korist človekovemu zdravju ter večji uporabi živil ali začimb, ki našemu zdravju koristijo. Z javno predstavitvijo rezultatov mojih sošolcem ter širši javnosti, bom pripomogla k ozaveščanju na področju, ki se ga morda premalo zavedamo; to kar pojemo, še ni nujno dostopno našemu telesu. Bio-dostopnost je kompleksen pojem, ki se ga je potrebno lotevati zelo previdno. V nalogi sem predstavila en možen način.

10 UPORABLJENI VIRI

- Ansari MJ, Ahmad S, Kohli K, Ali J, and Khar RK (2005). Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 39:str. 132–138.
- Alschuler, L. Turmeric (*Curcuma longa* L.). (2016). An Overview of the Research and Clinical Indications. Brown University., str. 1-10. Dostopno na: http://www.gaiaherbs.com/uploads/1614_HPR_Turmeric_ResearchPaper-1371567233.pdf (29.12. 2016)
- Ahsan, H.; Hadi, SM. (1998); *Curcuma*. *Cancer Lett.* 124, str. 23
- Azuine, M.A. Bhide, S.V. (1994). Adjuvant chemotherapy of experimental cancer. *J. Ethnopharmacol.*, 44, str. 211-217
- Balasubramanian, K. (2006). Molecular orbital basis for yellow curry spice curcumin's prevention of Alzheimer's disease. *J Agric Food Chem* 54: str. 3512–3520.
- Barik, A., Mishra, B., Kunwar, A., Kadam, R.M., Shen, L., Dutta, S., Padhye, S., Satpati, A.K., Zhang, H.Y., Priyadarsini, K. (2007) Comparative study of copper(II)-curcumin complexes as superoxide dismutase mimics and free radical scavengers. *Eur J Med Chem* 42: str. 431–439.
- Borsari M, Ferrari E, Grandi R, and Saladini M (2002). Curcuminoids as potential new iron-chelating agents: spectroscopic, polarographic and potentiometric study on their Fe(III) complexing ability. *Inorg Chim Acta* 328, str. 61–68.
- Desphande , S.S., Ingle, A., D., Maru, G.B., Inhibitory effects of curcumin-free aqueous turmeric extracts on benzo(a)pyrene-induced forestomach papilloma's in mice. *Cancer lett.*, 1997, 118, str. 79-85.
- Funk, J.L. Oyarzo, J.N. Frye, J.b. Turmeric extracts containing curcuminoids prevent experimental rheumatoid arthritis. *J. Nat. Prod.*, 2006, 69, str. 351-355
- Galano, A., Alvarez-Diduk, R., Ramirez-Silva, M.T., Alarcon-Angeles, G., Rojas-Hernandez, A. (2009). Role of the reacting free radicals on the antioxidant mechanism of curcumin. *Chem Phys* 363: str. 13–23.
- Goel, A., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B. (2008) Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol* 75:str. 787–809.
- Gorman, A.A., Hamblett, I., Srinivasan, V.S., Wood, P.D. (1994). Curcumin-derived transients: a pulsed laser and pulse radiolysis study. *Photochem Photobiol* 59: str. 389–398.
- Ghosh, M., Singh, A.T., Xu, W., Sulchek, T., Gordon, L., Ryan, R.O. (2011). Curcumin nanodisks: formulation and characterization. *Nanomedicine* 7:str. 162–167.
- Jiang T, Wang L, Zhang S, Sun PC, Ding CF, Chu YQ, and Zhou P (2011) Interaction of curcumin with Al(III) and its complex structures based on experiments and theoretical calculations. *J Mol Struct* 1004:str. 163–173
- Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Boone, C. W.; Simic, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, str. 9677.
- John, V. D.; Krishnankutty, K. (2005).; *Transition Metal Chem.* 30, str. 229.

- Kanhathaisong, S., Rattanaphani, S., Rattanaphani, V. (2010). A spectroscopic investigation of the complex of turmeric dye with copper(ii) in aqueous solution. *Suranaree J. Sci. Technol.* 18(2):str. 159-165
- Khalil, M.I.; Al-Zahem, A.M.; Al-Qunaibit, M.H. (2013). Synthesis, characterisation, Mössbauer parameters and anti-tumor activity of Fe(III) curcumin complex. *Bioinorg. Chem. Appl.* , str. 321
- Kolev, T.M., Velcheva, E.A., Stamboliyska, B.A., Spiteller, M. (2005). DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. *Int J Quantum Chem* 102: str. 1069–1079
- Khopde, S.M., Priyadarsini, K., Palit, D.K., Mukherjee, T. (2000). Effect of solvent on the excited-state photophysical properties of curcumin. *Photochem Photobiol* 72:str. 625–631
- Kiuchi, F., Goto, Y., Sugimoto, N., Akao, N., Kondo, K., Tsuda, Y. (1993). Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 41:1640–1643 Kunwar, A.; Barik, A.; Pandey, R.; Priyadarsini, K. I. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 2006, 1760, str. 1513.
- Kulkarni, S.J., Maske, K.N., Budre, M.P., Mahajan. Extraction and purification of curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L.). *IJPPT*, 2012, 1, str. 81-84
- Lao, C. D.; Demierre, M.-F.; Sondak, V. K. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2006, 6, str. 1559.
- Lee, K.J., Kim, Y.S., Ma, J.Y. Separation and Identification of Curcuminoids from Asian Turmeric (*Curcuma longa* L.) using HPLC and LC-MS. *Asian Journal of Chemistry*, 2013, 25, , 2, str. 909 - 912
- Modasiya, M.K., Patel, V.M. Studies on solubility of curcumin. *International journal of pharmacy & life sciences*, 2012, ISSN: 0976-7126.
- Mohammadi, K.; Thompson, K. H.; Patrick, B. O.; Storr, T.; Martins, C.; Polishchuk, E.; Yuen, V. G.; McNeill, J. H.; Orvig, C.; J. (2005). *Inorg. Biochem.* 99, str. 2217.
- Mohri, K., Watanabe, Y., Yoshida, Y., Satoh, M., Isob, K., Sugimoto, N., Tsuda, Y. (2003). Synthesis of glycosylcurcuminoids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 51: str. 1268–1272
- Naz, S., Jabeen, S., Ilyas, S., Manzoor, M., Aslam, F., Ali, A. (2010). Antibacterial activity of *curcuma longa* varieties against different strains of bacteria. *Pak. J. Bot.*, 42(1): str. 455-462.
- Nabati, M., Mahkam, M., Heidari, H. Isolation and characterisation of curcumin from Powdered rhizomes of turmeric plant, Iran. *Chem. Commun.* , 2014, 2, str. 236 - 246
- Nardo L, Paderno R, Andreoni A, Masson M, Haukvik T, and Tønnesen HH (2008) Role of H-bond formation in the photoreactivity of curcumin. *Spectroscopy* 22: str. 187–198
- NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Dostopno na: <https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0414.html> (29.12. 2016)
- Payton, F., Sandusky, P., Alworth, W.L. (2007). NMR study of the solution structure of curcumin. *J Nat Prod* 70: str. 143–146.
- Palipoch, S., Punsawad, C., Koomhin, P., Suwannalert, P., Hepatoprotective effect of curcumin and alpha-tocopherol against cisplatin-induced oxidative stress. *BMC Complement Altern Med.* 2014 Mar 28;14: str. 111.

- Pawar, H., Karde, M., Mundle, N., Jadhav, P. Mehra, K. Phytochemical Evaluation and Curcumin Content determination of Turmeric Rhizomes Collected from Bhandra District of Maharashtra (India). *Medicinal Chemistry*, 2014, 4 (8), str. 588-591
- Priyadarsini, K. I. (2014). The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules*, 19, str. 20091-20112
- Rahil, J. , Pratt, R.F. (1977). On the alkaline hydrolysis of beta-dicarbonyl compounds. *J Am Chem Soc* 99:str. 2661–2665
- Robinson, T.P., Hubbard. R.B. , Ehlers, T.J., Arbiser, J.L., Goldsmith, D.J., Bowen, J.P. (2005). Synthesis and biological evaluation of aromatic enones related to curcumin. *Bioorg Med Chem* 13: str. 4007–4013
- Robles, H. (1998). "Benzene". V: *Encyclopedia of Toxicology*, vol. 1 (str. 133-4); urednik Weller P. idr. San Diego itd.: Academic Press. ISBN 0-12-227221-8
- Roughley, P.J. , Whiting, D.A. (1973). Experiments in the biosynthesis of curcuminoids. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*:2379–2388. Ruby, A. J.; Kuttan, G.; Babu, K. D.; Rajasekharan, K. N.; Kuttan, R. *Cancer Lett.* 1995, 94, str. 79.
- Shi, M.; Cai, Q.; Yao, L.; Mao, Y.; Ming, Y.; Ouyang, G. *Cell Biol. Int.* 2006,30, str. 221.
- Shiyou, L. Yuan, W. Deng, G., Wang, P., Yang, P. Aggarwal, B. Chemical composition and product quality control of Turmeric (*Curcuma Longa L.*). *Pharmaceutical crops.*, 2011, 2 str. 28- 54
- Song, Z., Feng, R., Sun, M., Guo, C., Gao, Y., Li, L., Zhai, G. (2011). Curcumin-loaded PLGA-PEG-PLGA triblock copolymeric micelles: Preparation, pharmacokinetics and distribution in vivo. *J Colloid Interface Sci* 354: str. 116–123
- Taylor, S.J., McDowell, I.J. (1992). Determination of the curcuminoid pigments in turmeric (*Curcuma doemstica Val*) by reverse-phase HPLC. *Chromatographia*, 34, str. 73-77-
- Tønnesen, H.H. ,Karlsen, J. (1985). Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z Lebensm Unters Forsch* 180: str. 402–404.
- Tønnesen, H.H., Karlsen, J., . van Henegouwen, G.B. (1986). Studies on curcumin and curcuminoids. VIII. Photochemical stability of curcumin. *Z Lebensm Unters Forsch* 183: str. 116–122
- Unterhalt, B. (1980). Turmeric and its application in mustard. *Z Lebensm Unters Forsch* 170:str. 425–428
- US Department of Commerce, National BureauStandards, 1971.
- Vautier-Giongo, C.; Yihwa, C.; Moreira, P. F. J.; Lima, J. C.; Freitas, A. A.; Alves, M.; Quina, F. H.; Macüanita, A. L. *Langmuir*, 2002, 18, str. 10109.
- Zebib, B., Mouloungui, Z., Noirot, V. (2010). Stabilization of curcumin by complexation with divalent cations in glycerol/water system. *Bioinorg Chem Appl* , str. 292760
- Wang, Y.-J.; Pan, M.-H.; Cheng, A.-L.; Lin, L.-I.; Ho, Y.-S.; Hsieh, C.-Y.; Lin, J.-K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997, 15, str.1867.

Yang, F.; Lim, G. P.; Begum, A. N.; Ubeda, O. J.; Simmons, M. R.; Ambegaokar, S. S.; Chen, P. P.; Kayed, R.; Glabe, C. G.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M. J. *Biol. Chem.* 2005, 280, str. 5892.

Yuan, B., Imai, M., Kikuchi, H., Fukushima, S., Hatzama, S., Akaike, T., Yoshino, Y., Ohyama, K., Hu, X., Pei, X., Toyoda, H. (2012). Cytocidal Effects of Polyphenolic Compounds, Alone or in Combination with, Anticancer Drugs Against Cancer Cells: Potential Future Application of the Combinatory Therapy. DOI: 10.5772/50218