



Zdravilne učinkovine v popru

Modul za eksperimentalno
raziskovalno delo nadarjenih
dijakov

doc. dr. Miha Slapničar

Tia Kralj

Aljaž Debelak

prof. dr. Iztok Devetak



DiSSI
Diversity in Science
towards Social Inclusion



Univerza v Ljubljani

Kazalo

UVOD	3
SOCIO-NARAVOSLOVNI PROBLEM	4
NAMEN EKSPERIMENTALNO-RAZISKOVALNEGA DELA	5
NAČRT IZVEDBE EKSPERIMENTALNEGA DELA	5
NAČRT IZVEDBE EKSPERIMENTALNEGA DELA	7
1. Naloga eksperimentalno raziskovalnega dela.....	7
2. Raziskovalno vprašanje	7
3. Raziskovalna hipoteza.....	8
4. Načrtovanje izvedbe eksperimentalnega dela.....	8
5. Predviden čas izvedbe eksperimenta	8
6. Potrebščine	8
7. Kemikalije.....	8
8. Zaščita in varnost pri eksperimentalnem delu ter odstranjevanje odpadkov.....	9
9. Skica aparature	9
10. Zbiranje podatkov med eksperimentalnim delom	9
11. Rezultati.....	10
12. Interpretacija rezultatov eksperimentalnega dela	10
13. Zaključek	11
14. Evalvacija.....	11
EKSPERIMENTALNO DELO	12
1. Izolacija piperina in zmesi ostalih piperidinskih alkaloidov.....	12
Potrebščine in kemikalije.....	13
VARNOST PRI EKSPERIMENTALNEM DELU	14
POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA	14
RAVNANJE Z ODPADKI	14
VPRAŠANJA ZA DODATNA ZNANJA	15
2. Dokaz piperina in zmesi ostalih piperidinskih alkaloidov	16
Potrebščine in kemikalije.....	16
VARNOST PRI EKSPERIMENTALNEM DELU	17
POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA	17
RAVNANJE Z ODPADKI	18
VPRAŠANJA ZA DODATNA ZNANJA	19
3. Preizkus antioksidativne vloge piperina in zmesi ostalih piperidinskih alkaloidov na vzorcu prostih DPPH• radikalov	20
Potrebščine in kemikalije.....	20
VARNOST PRI EKSPERIMENTALNEM DELU	20
POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA	21
VPRAŠANJA ZA DODATNA ZNANJA	23
LITERATURA	24

UVOD

Narava je neizčrpen vir navdiha za vse, ki v njej radi raziskujemo. Znano je, da obstaja že več kot 60 milijonov spojin, od katerih pa je kar 80 % organskih. Osnova vsem organskim spojinam je skelet ogljikovih atomov, na katerega so kovalentno vezani še atomi vodika, kisika, dušika, žvepla, in fosforja, lahko tudi atomi halogenih elementov. Velika večina organskih spojin, ki so tako ali drugače del naših življenj, so naravne spojine (Kurniawan idr., 2021).

Vse naravne spojine imajo v okolju določeno funkcijo in učinek. Veliko naravnih spojin različnim organizmom predstavlja vir hrane ali energije, spet drugim pa koristijo za obrambo pred plenilci. Barvilne snovi, ki se sintetizirajo pri biokemijskih procesih v celicah, imajo ključno vlogo pri procesu fotosinteze in prenosu kisika v krvi. V živalskem svetu predstavljajo svarilne in varovalne barve, v obdobju dvorjenja in parjenja pa služijo za prepoznavanje in izkazovanje moči. V rastlinskem svetu naravne barvilne snovi med drugim služijo tudi za privabljanje oprashačevalcev in raznašalcev semen (Grošelj idr., 2019; Sequin, 2017; Slapničar in Boh Podgornik, 2021).

Naravne spojine se sintetizirajo v naravi, v živih organizmih – rastlinah in živalih. Človek se je že v starejši kameni dobi (*2 milijona let pr. n. št.*) prehranjeval z rastlinami, ki jih je nabral v naravi in z živalmi, ki jih je ulovil. Kadar je zbolel, je nagonsko in po izkušnjah poiskal hrano, ki mu je lajšala težave. Nekatere rastline je začel uporabljati kot zdravilo, poznal pa je tudi strupene rastline, iz katerih je pripravljajl strupe za puščice, ki jih je potreboval za lov in boj. V kasnejšem času je s poznavanjem naravnih barvil rumenih, rdečih in rjavih odtenkov barval tekstilije iz bombaža, volne, svile ali lana, ki so mu služile kot oblačila ... Človek, rastline in živali ter naravne spojine iz njih, na veliko različnih področjih uporablja tudi danes (Firn, 2010; Prijatelj, 2005).

V zadnjih desetletjih so znanstveniki na osnovi rastlinskih zdravilnih učinkovin razvili tudi številne sintetične ali plosintetične zdravilne učinkovine. Kljub velikemu številu raznovrstnih zdravil, pridobljenih iz naravnih virov, še vedno ne moremo pozdraviti vseh bolezni, pogosto pa je zdravljenje tudi dolgotrajno ali pa ima neželene posledice. Farmacevtska industrija vseskozi poskuša najti nova, učinkovitejša in manj škodljiva zdravila in tu so rastline ključnega pomena. Danes si namreč farmacijo težko predstavljamo brez rastlin in njihovih proizvodov s številnimi znanimi zdravilnimi učinkovinami. Poudariti velja, da je še veliko neraziskanih rastlinskih vrst, nekatere med njimi so potencialni vir novih zdravilnih učinkovin. Pri masovnem izkoriščanju rastlin je potrebno paziti, da rastlinske vrste v naravnem okolju niso ogrožene. Zavedanje, da je človek odvisen od rastlin je pomembno. Le če bomo uspeli ohraniti naravo, bomo od tega imeli korist tudi sami, sicer ne bodo oškodovane samo rastline, ampak tudi človek (Bhat idr., 2005; Cseke idr., 2006; Prijatelj, 2005).

SOCIO-NARAVOSLOVNI PROBLEM

Znano je, da imajo lahko sintetične zdravilne učinkovine poleg želenih in koristnih učinkov tudi neželene in škodljive. Neželen učinek zdravila je škodljiva in nenamerna reakcija, do katere lahko pride pri odmerkih, ki se običajno uporabljajo za preprečevanje, diagnosticiranje ali zdravljenje bolezni. Ti se najpogosteje pojavljajo pri starejših ljudeh, otrocih, bolnikih z večjim številom bolezni in zato tudi z več zdravili ter pri bolnikih s slabšim delovanjem ledvic ali jeter. V Sloveniji je okoli 3 % bolnikov napotenih v urgentne internistične ambulante zaradi neželenih učinkov zdravil. Kar tretjina obravnavanih bolnikov je imela neželene učinke zaradi medsebojnega delovanja dveh ali več sintetičnih zdravilnih učinkovin. O podobnih številkah pa poročajo tudi drugje po svetu (Abazović, 2015).

Opisane neželene učinke pa nimajo le zdravilne učinkovine v zdravilih, temveč tudi drugi sintetični pripravki, ki jih človek za različne namene vsakodnevno uporablja. Pomembno je poudariti, da so tudi spojine izolirane iz rastlinskega materiala lahko strupene, vendar pa pozna človeštvo njihovo strupenost že od nekdaj: ta navadno ni v njihovih neželenih učinkih, ampak v prevelikem odmerku, v preveč stopnjevanem »glavnem« (in edinem) učinku, ki bi bil v manjšem odmerku in pravem primeru le zdravilen (Sequin, 2017).

V tem modulu boš spoznal eno izmed mnogih zdravilnih rastlin, črni poper (*Piper nigrum* L.). Gre za eno najbolj vsestranskih začimb, ki se zaradi izrazite arome in ostrine uporablja v vsaki kuhinji. Za stare Egipčane je služil kot sestavina v balzamirani mešanici, stari Arijci pa so ga uporabljali kot dragoceno drogo. Različni deli rastline se predvsem zaradi visoke vsebnosti sekundarnih metabolitov uporabljajo kot zdravila, konzervansi in kot naravna sredstva s širokim spektrom uporabe (Ahmad idr., 2015).

Plodovi črnega poprovca imajo veliko zdravilno vrednost. Izsledki različnih raziskav kažejo, da zaradi visoke vsebnosti sekundarnih metabolitov črni poper deluje antiapoptotično (Pathak in Khandelwal, 2007), antibakterijsko (Chaudhry in Tariq, 2003), protiglivično (Arslan idr., 2009), protivnetno (Singh in Duggal, 2009), antispazmolitično (Kumar idr., 2007), antitumorno (Sunila in Kuttan, 2004), alelopatsko (Siddiqui, 2007), antioksidativno (Pathak in Khandelwal, 2007), insekticidno (Scott idr., 2008). Vegetativni deli črnega poprovca se v medicini uporabljajo za zaščito pred oksidativnim stresom (Ahmad idr., 2015). Glavni alkaloid v popru – piperin izboljšuje tudi biološko uporabnost različnih cepiv, povečuje biološki izkoristek aktivnih komponent, regulira izločanje antiepileptičnih aktivnih snovi, aktivira biološke membrane za lažjo absorpcijo aktivnih učinkovin, deluje tudi kot inhibitor na rast tumorskih celic, inhibira mitohondrijsko oksidativno fosforilacijo idr. (Ahmad idr., 2015). Uživanje pripravkov iz črnega popra lahko stimulira prebavne encime trebušne slinavke in črevesja ter poveča izločanje žolčne kisline (Pathak in Khandelwal, 2007). Z uporabo piperina je mogoče preprečiti oz. zmanjšati drisko. S poskusom na miših so ob aplikaciji piperina dokazali zmanjšanje akumulacije črevesne tekočine (Singh in Duggal, 2009). Črni poper ima tudi fungicidne lastnosti, zato se ga uporablja za varstvo rastlin pred boleznimi in škodljivci (Ahmad idr., 2015).

NAMEN EKSPERIMENTALNO-RAZISKOVALNEGA DELA

Vaša naloga bo po navodilih izvesti izolacijo in dokaz prevladujočega alkaloida piperina ter zmes ostalih piperidinskih alkaloidov iz različnih vrst plodov črnega poprovca (*Piper nigrum* L.). Po navodilih boste na vzorcu prostih DPPH• radikalov preizkusili tudi antioksidativno vlogo piperina.

V svojem eksperimentalno-raziskovalnem delu boste po vzoru prvega dela načrtovali eksperiment, v katerem boste preizkušali še kakšno drugo biološko vlogo piperina oziroma skupine piperidinskih alkaloidov in drugih sekundarnih metabolitov iz različnih vrst plodov črnega poprovca (*Piper nigrum* L.).

NAČRT IZVEDBE EKSPERIMENTALNEGA DELA

Preberite pregledni znanstveni članek »*Piperin ter njegove fizikalno-kemijske in biološke lastnosti*«. Z uporabo aplikacije *QR scanner* »skenirajte« priloženo QR kodo.



Vsebino znanstvenega članka predstavite v obliki miselnega vzorca.

Glede na namen eksperimentalno-raziskovalnega dela načrtujte izvedbo svojega eksperimentalnega dela tako, da po stopnjah opišete potek dela. Pri načrtovanju raziskave predvidite, da že imate izolirano zmes piperidinskih alkaloidov različnih vrst plodov črnega poprovca (*Piper nigrum* L.). V načrt vključite:

- Nalogo eksperimentalno-raziskovalnega dela (*Kaj je cilj mojega eksperimentalnega dela?*).
- Raziskovalno vprašanje (*Kaj želimo izvedeti?*).
- Raziskovalna hipoteza (*Kaj predvidevamo, da se bo zgodilo? Zakaj?*).
 - Neodvisna spremenljivka (*Spremenljivka, ki jo spreminjamo.*).
 - Odvisna spremenljivka (*Spremenljivka, ki jo merimo ali opazujemo.*).
 - Konstante (*Da bo eksperiment pošten, ne bomo spreminjali naslednjih spremenljivk.*)
- Načrtovanje izvedbe eksperimentalnega dela (*Kaj bomo naredili, da bomo odgovorili na raziskovalno vprašanje?*).
- Predviden čas izvedbe eksperimenta (*Koliko časa bom potreboval, da izvedem celoten eksperiment? Kako bom časovno načrtoval potek eksperimentalnega dela?*).
- Potrebščine (*Kateri laboratorijski inventar potrebujemo za izvedbo eksperimentalnega dela, da bomo lahko odgovorili na raziskovalno vprašanje?*).
- Kemikalije (*Katere snovi potrebujemo za izvedbo eksperimentalnega dela, da bomo lahko odgovorili na raziskovalno vprašanje?*).
- Zaščita in varnost pri eksperimentalnem delu ter ravnanje z odpadki (*Kaj moramo upoštevati z vidika kemijske varnosti? Kam in kako bomo odstranili kemijske odpadke?*).
- Skica aparature (*Kako bo izgledala aparatura s katero bomo izvajali eksperiment?*).
- Zbiranje podatkov med eksperimentalnim delom (*Kako bomo zbirali in beležili eksperimentalne podatke?*).
- Rezultate (*Kako bomo prikazali, kaj se je zgodilo? S preglednico, grafom ali kako drugače? Pomembno je, da zapišemo opažanja in iz njih, na podlagi teoretičnih izhodišč, izpeljemo ustrezne sklepe.*).
- Interpretacija rezultatov eksperimentalnega dela (*Kaj nam povedo zbrani rezultati? Katere sklepe lahko izpeljemo?*).
- Zaključek (*Hipoteze – potrditev ali ovrženje.*).
- Evalvacija (*Kako zanesljivi so rezultati? Če bi še enkrat izvajali raziskavo, kaj bi spremenili? So se ob eksperimentalnem delu postavila kakšna nova raziskovalna vprašanja?*).

Skrbno pripravljen načrt izvedbe eksperimentalnega dela predstavite učitelju. Pogovorite se, katere stvari bi bilo dobro izboljšati, na katere stvari bi bilo potrebno pri eksperimentalnem delu še posebno paziti ipd.

Ko učitelj odobri predstavljen načrt, lahko pričnete z izvedbo eksperimentalnega dela.

NAČRT IZVEDBE EKSPERIMENTALNEGA DELA

1. Naloga eksperimentalno raziskovalnega dela

2. Raziskovalno vprašanje

3. Raziskovalna hipoteza

3.1 Neodvisna spremenljivka:

3.2 Odvisna spremenljivka:

3.3 Konstante:

4. Načrtovanje izvedbe eksperimentalnega dela

5. Predviden čas izvedbe eksperimenta

6. Potrebščine

7. Kemikalije

<i>Kemikalija</i>	<i>Piktogram</i>

Piktogrami



8. Zaščita in varnost pri eksperimentalnem delu ter odstranjevanje odpadkov

9. Skica aparature

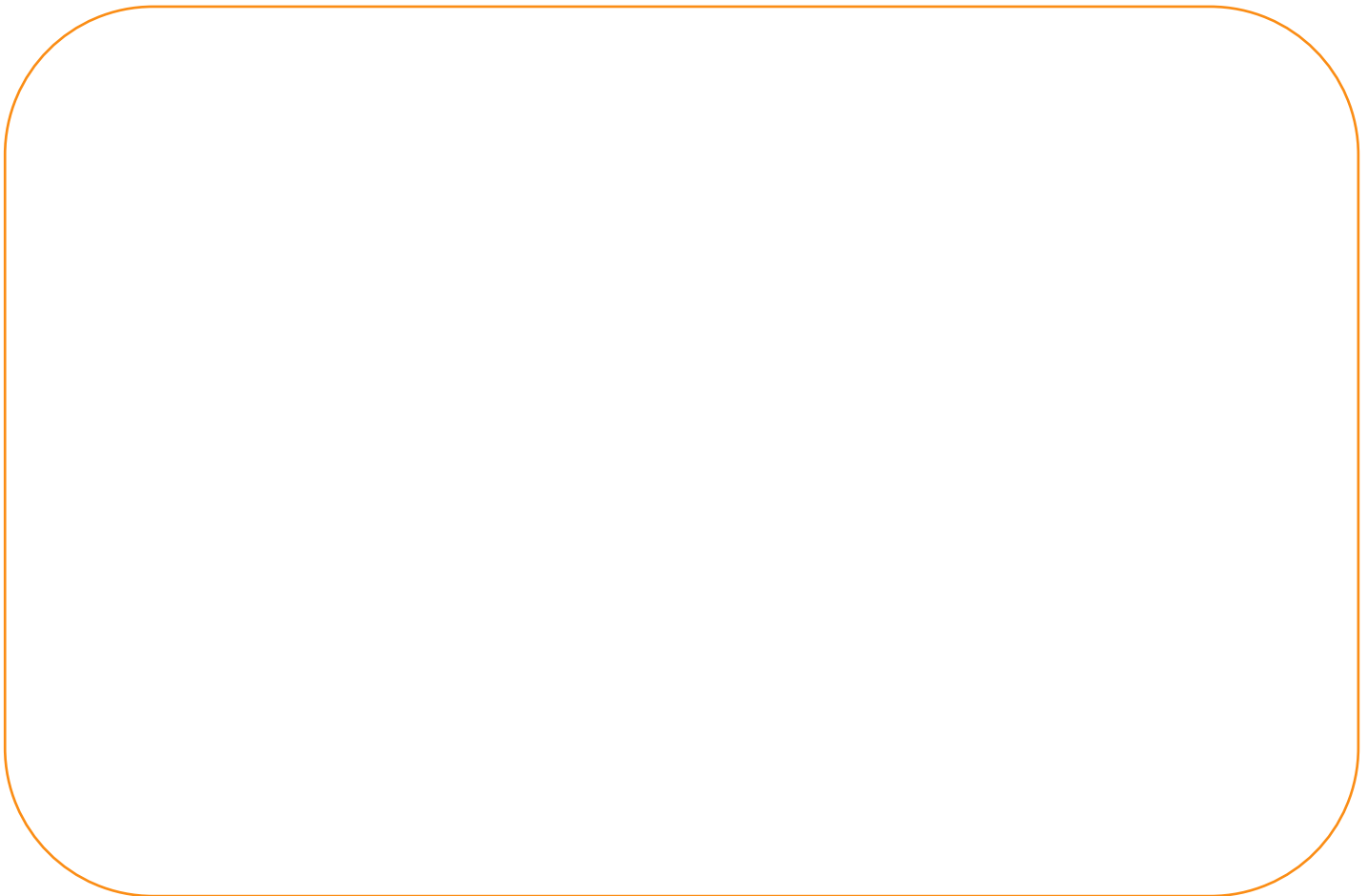
10. Zbiranje podatkov med eksperimentalnim delom

11. Rezultati

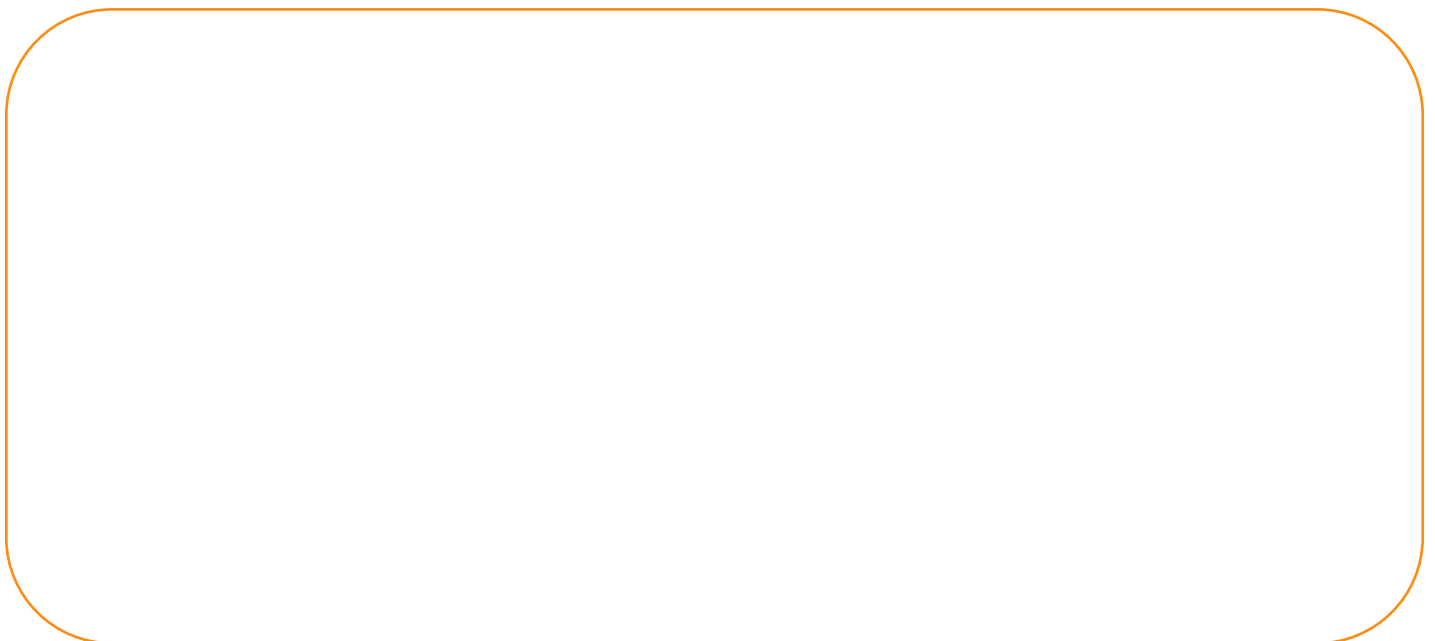
Opazanja	Sklepi

12. Interpretacija rezultatov eksperimentalnega dela

13. Zaključek



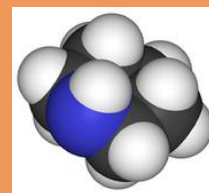
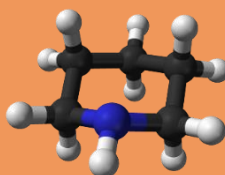
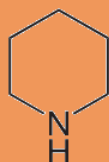
14. Evalvacija



EKSPERIMENTALNO DELO

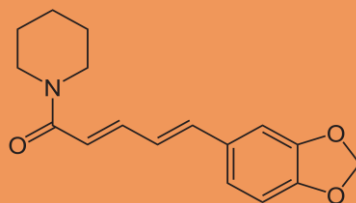
1. Izolacija piperina in zmesi ostalih piperidinskih alkaloidov

Piperin je pomemben alkaloid, ki se pojavlja v rastlinah iz družine poprovk (lat. Piperaceae). Glede na kemijsko zgradbo ga uvrščamo v alkaloidno skupino piperidinov. Piperidin (tudi heksahidropiridin, azacikloheksan, pentametilenamin ali azinan) (slika 1) je šestčlenski heterociklični sekundarni amin z molekulsko formulo $(\text{CH}_2)_5\text{NH}$.



Slika 1: Skeletna formula, slika krogličnega in kalotnega modela molekule piperidina

Glavni predstavnik te skupine alkaloidov, piperin (slika 2), je sestavljen iz aromatskega (5-(3,4-metilendioksifenil)) in aminskega dela (piperidin), oba dela pa povezuje aciklična alifatska veriga.



Slika 2: Skeletna formula molekule piperina





Piperin je kristalinična spojina rumene barve, ki je pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju. Tališče ima pri temperaturi med 128 in 130 °C, njegovo vrelišče pa je temperatura, pri kateri spojina razpade. Je šibka baza, ki je v vodi slabo topna (40 mg/L), kar pa je poleg tega, da lahko deluje toksično na osrednji živčni in reprodukcijski sistem, vzrok, da je uporaba piperina v farmacevtski industriji omejena. V nasprotju z vodo je piperin dobro topen v alkoholu, etru in v klorofomu. Rastopina piperina z alkoholom ima poprast okus. Piperin lahko z močnimi kislinami tvori soli.

Še več informacij o piperinu lahko preberete v podatkovni zbirki *PubChem*. Z uporabo aplikacije *QR scanner* »skenirajte« priloženo QR kodo.



Potrebščine in kemikalije

Potrebščine
<i>Izolacija piperina in zmesi ostalih piperidinskih alkaloidov</i>
100 mL destilacijska bučka
2 trinožni stojali
Mufa
Prižema
Povratni hladilnik
Štirinožno stojalo
Steklokeramična plošča
Gorilnik
25 mL merilni valj
Nuča
Filtrirni papir
Vodna črpalka
Rotavapor
250 mL erlenmajerica
Ledena kopel
Spatula
Epruveta
Plastična kapalka
Vrelni kamenčki

Kemikalija	Piktogram
15 g mletega črnega ali belega ali zelenega popra	/
Diklorometan	
Dietil eter	
Aceton	
Heksan	

VARNOST PRI EKSPERIMENTALNEM DELU

Pri eksperimentalnem delu so obvezna zaščitna halja, očala. Pred začetkom je potrebno skrbno prebrati navodila za varno delo s kemikalijami na steklenicah ali plastenkah oziroma med delom upoštevati oznake za nevarne snovi.

POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA

Izolacija piperina in zmesi ostalih piperidinskih alkaloidov

1. V 100 mL destilacijsko bučko dodajte 15,0 g mletega črnega ali belega ali zelenega popra.
2. Z merilnim valjem odmerite 25 mL diklorometana in ga zlijte v destilacijsko bučko z mletim poprom. V destilacijsko bučko dodajte še tri vrele kamenčke in zmes v bučki dobro premešajte.
3. Pod bučko podstavite štirinožno stojalo s steklokeramično ploščo in gorilnik.
4. Destilacijsko bučko opremite s povratnim hladilnikom in zmes 30 minut reflukturajte.
5. Po 30-minutnem refluxu počakajte pet minut, da se zmes ohladi, nato netopni ostanek odnučirajte v suho presesalno erlenmajerico. Ostanek na filtru nuče (t. i. matičnico oz. filtrat) še dvakrat sperite s 5 mL diklorometana.
6. Filtrat prenesite v bučko in diklorometan oddestilirajte z uporabo rotavaporja (destilacija pod znižanim tlakom). Izparevanje diklorometana lahko izvedete tudi v izparilnici ob segrevanju na steklokeramični plošči. Izparevanje izvajajte v digestoriju.
7. Oljnati snovi temno rjave barve, ki ostane v bučki (oziroma v izparilnici) po destilaciji, dodajte 5 mL dietil etra in ohladite. Za hlajenje uporabite ledeno kopel. Med 15-minutnim hlajenjem olje s spatulo ves čas intenzivno mešajte z drgnjenjem ob steno bučke (oziroma ob steno izparilnice), da izzovete kristalizacijo alkaloida piperina.
8. Surov piperin nato prekrizalizirajte iz sveže pripravljene zmesi topil aceton : heksan v razmerju 3 : 2, tako da v epruveto s kapalko odmerite 3 mL acetona in 2 mL heksana. Zmesi izolata s kapalko dodajte 1 mL pripravljene zmesi topil. Nastalo zmes s spatulo intenzivno mešajte, da se ves surov piperin raztopi v zmesi in dokler vse topilo popolnoma ne izhlapi. Prekrizaliziran produkt je zmes s teksturo paste.

RAVNANJE Z ODPADKI

Med in po končanem eksperimentalnem delu je potrebno ustrezno zbirati in ločevati uporabljene snovi (jih na primer odliti v posebej pripravljene posode). Pri odstranjevanju kemijskih odpadkov iz laboratorija je potrebno upoštevati predpise, ki veljajo za kemične odpadke v industriji, pri čemer je potrebno upoštevati navodila na varnostnih listih posameznih kemikalij.

VPRAŠANJA ZA DODATNA ZNANJA

1. Pojasnite, zakaj ste v destilacijsko bučko k mletemu popru dodali nepolarno organsko topilo diklorometan?

2. Za prekristalizacijo piperina uporabite zmes topil aceton : heksan = 3 :2. Bi bila prekristalizacija enako uspešna, če bi izbrali zmes dveh polarnih topil? Pojasnite.

3. Definirajte pojem »kristalizacija«.

4. Zapišite bistvene korake kristalizacijskega postopka.

5. katerim lastnostim čistih snovi moramo prilagoditi postopek za čiščenje in izolacijo reakcijskih produktov?

6. Na katere načine lahko preverimo čistost izoliranega vzorca?

7. Naštejte vzroke, zaradi katerih je mogoče, da kristali pri postopku kristalizacije po ohlajanju ne izpadejo.

2. Dokaz piperina in zmesi ostalih piperidinskih alkaloidov

Potrebščine in kemikalije

Potrebščine
<i>Dokaz s tankoplastno kromatografijo</i>
Steklena kadička s pokrovom
Silikagelna kromatografska plošča
Navadni svinčnik
50 mL čaša
Plastična kapalka
Spatula
Steklena palčka
Steklena kapilara
UV lučka
<i>Dokaz z reakcijo Dragendorffovega testa</i>
2 50 mL čaši
2 stekleni palčki
4 plastične kapalke
25 mL merilni valj
3 epruvete

Kemikalija	Piktogram
<i>Dokaz s tankoplastno kromatografijo</i>	
Standard piperina	
Aceton	
Heksan	
<i>Dokaz z reakcijo Dragendorffovega testa</i>	
Bizmutov nitrat(V) pentahidrat	
Klorovodikova kislina	
Kalijev jodid	
Etanol	

VARNOST PRI EKSPERIMENTALNEM DELU

Pri eksperimentalnem delu so obvezna zaščitna halja, očala. Pred začetkom je potrebno skrbno prebrati navodila za varno delo s kemikalijami na steklenicah ali plastenkah oziroma med delom upoštevati oznake za nevarne snovi.

POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA

1. *Dokaz s tankoplastno kromatografijo*

1. Pripravite zmes sveže mobilne faze za tankoplastno kromatografijo, tako da zmešate 30 mL acetona in 20 mL heksana (razmerje komponent 3 : 2).
2. Zmes mobilne faze previdno prelijte v stekleno kadičko do višine 1 cm.
3. Kadičko zaprite, da se nasiti s hlapi mobilne faze, kar pripomore k boljši ločbi.
4. Na primerno veliko kromatografsko ploščo (širina 12 cm, dolžina 15 cm) s svinčnikom rahlo narišite startno črto 2 cm od spodnjega roba. Pazite, da pri tem ne poškodujete plasti silikagela.
5. Standardni vzorec in vzorec izoliranega piperina pripravite tako, da v majhno stekleno posodico s kapalko odmerite pet kapljic acetona in v njih raztopite konico spatule ustreznega piperina.
6. S stekleno kapilaro nanesite izoliran piperin in standardni vzorec piperina na startno črto, tako da se kromatografske plošče pod pravim kotom enkrat dotaknete s kapilaro.
7. Med posameznimi nanosi mesto na kromatografski plošči osušite. Pri nanašanju izoliranega piperina in njegovega standarda s kapilarama pazite, da ne poškodujete plasti silikagela. Na kromatografski plošči označite, kateremu izvlečku pripada posamezna lisa na startni črti.
8. Kromatografsko ploščo z nanešenima vzorcema izoliranega piperina in njegovega standarda previdno postavite v kadičko, ki je nasičena s hlapi mobilne faze.
9. Ko mobilna faza pripotuje približno dva centimetra do zgornjega roba plošče, vzemite kromatografsko ploščo iz kadičke. S svinčnikom takoj rahlo označite mejo, do katere je pripotovala mobilna faza.
10. Topila iz kromatografske komore zlijte v posebej za to označeno posodo.
11. Izoliran piperin in njegov standardni vzorec v zatemnjenem prostoru vizualizirajte z UV-lučko. Na stacionarni fazi impregnirani s fluorescentno spojino (npr. cinkov silikat aktiviran z manganom), ki fluorescira po absorpciji UV svetlobe 254 nm, so spojine vidne kot temne lise na fluorescentnem, svetlozeleno obarvanem ozadju.

Še več o dokazovanju piperina in ostalih piperidinskih alkaloidih si lahko preberete na spletni strani podjetja *Merck*. Z uporabo aplikacije *QR scanner* »skenirajte« priloženo QR kodo.



2. Dokaz z reakcijo Dragendorffovega testa

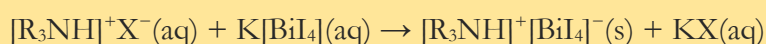
1. Pripravite standardno raztopino piperina, ki jo boste kot enega izmed dveh kontrolnih vzorcev potrebovali v vseh štirih dokaznih reakcijah izoliranega piperina (izoliranih alkaloidov). V 50 mL čašo dajte konico spatule standardnega piperina in s kapalko dodajte 5 mL 96 % etanola. Zmes s stekleno palčko mešajte toliko časa, da se v etanolu raztopi ves piperin.
2. Pripravite raztopino izoliranega piperina (raztopino izoliranih alkaloidov), tako da v 50 mL čašo s kapalko odmerite 5 mL 96 % etanola, v katerem raztopite konico spatule izoliranega piperina. Zmes s stekleno palčko mešajte toliko časa, da se v etanolu raztopi ves izoliran piperin.
3. Pripravite Dragendorffov reagent, tako da v eno 50 mL čašo zatehtate 0,25 g bizmutovega nitrata(V) pentahidrata in vanjo s kapalko dodate 5 mL koncentrirane klorovodikove kisline. Zmes s stekleno palčko mešajte toliko časa, da se ves bizmutov nitrat(V) pentahidrat raztopi v klorovodikovi kislini. V drugo 50 mL čašo zatehtajte 2,0 g kalijevega jodida in vanjo z merilnim valjem odmerite 10 mL destilirane vode. Zmes s stekleno palčko mešajte toliko časa, da se ves kalijev jodid raztopi v destilirani vodi. Vodno raztopino kalijevega jodida s kapalko po kapljicah dodajate v kislno raztopino bizmutovega nitrata(V) do obstojne temno oranžne barve. Novonastala raztopina je Dragendorffov reagent.
4. Pripravite tri epruvete. V prvo epruveto (kontrolni vzorec 1) s kapalko odmerite 1 mL etanolne raztopine standardnega piperina, v drugo epruveto (kontrolni vzorec 2) 1 mL 96 % etanola in v tretjo epruveto 1 mL etanolne raztopine izoliranega piperina. V vsako epruveto s kapalko dodajte 1 mL pripravljenega Dragendorffovega reagenta. Vsako epruveto dobro pretresite.

Dragendorffov test

Test izvajamo z Dragendorffovim reagentom (odkritelj nemški farmacevt Johan Georg Dragendorff (1836–1898)), ki je rdeče-rjava kislina raztopina bizmutovega nitrata(V) in kalijevega jodida. Dokaz za prisotnost alkaloidov v vzorcu je nastanek značilne oranžno-rdeče oborine. Veliko alkaloidov ima v svoji heterociklični strukturi kovalentno vezan terciaren dušikov atom, ki reagira bazično in s kislino tvori ustrezno, v vodi dobro topno amonijevo sol:



Med nastalo v vodi dobro topno amonijevo soljo in kalijevim jodobizmutatom(III) poteče obarjalna kemijska reakcija, pri kateri med raztopino amonijeve soli in raztopino jodobizmutatnih anionov nastane oborina oranžno-rdeče barve:



Odenki barve oborine so odvisni od vrste alkaloida, ki ga dokazujemo.

RAVNANJE Z ODPADKI

Med in po končanem eksperimentalnem delu je potrebno ustrezno zbirati in ločevati uporabljene snovi (jih na primer odliti v posebej pripravljene posode). Pri odstranjevanju kemijskih odpadkov iz laboratorija je potrebno upoštevati predpise, ki veljajo za kemične odpadke v industriji, pri čemer je potrebno upoštevati navodila na varnostnih listih posameznih kemikalij.

VPRAŠANJA ZA DODATNA ZNANJA

1. Opredelite stacionarno in mobilno fazo pri poskusu tankoplastne kromatografije izoliranega piperina.

2. Kaj lahko sklepate na kromatogram tankoplastne kromatografije? Svoj odgovor utemeljite.

3. Katera je skupna lastnost vseh alkaloidov?

4. Kje v naravi lahko najdemo alkaloide?

5. Katere so bistvene funkcije alkaloidov v naravi? Naštejte tudi nekaj konkretnih primerov.

6. Alkaloidi imajo velik pomen za človeka. Zapišite vsaj pet različnih področij, ki temeljijo na uporabi različnih vrst alkaloidov.



7. Opredelite sestavo Dragendorffovega reagenta.

8. Pojasnite nastanek oborine značilne barve. V pojasnilo vključite tudi razlago na simbolni ravni.

3. Preizkus antioksidativne vloge piperina in zmesi ostalih piperidinskih alkaloidov na vzorcu prostih DPPH• radikalov

Potrebščine in kemikalije

Potrebščine
<i>Priprava metanolne raztopine DPPH• prostih radikalov</i>
Tehnica
Spatula
25 mL bučka
Ultrazvočna kopel (<i>Ultrasonic cleancer ASonic 220V/50Hz, PRO 50</i>)
Aluminijasta folija
Hladilnik
<i>Spektrometrično določanje absorbance raztopine DPPH ob dodatku izvlečkov poprov</i>
Vroča vodna kopel
Centrifuga (<i>Cold LabExperts</i>)
Epice
Kivete
Mikropipeta
UV-VIS spektrometer (<i>Go direct Spectrovis plus</i>)
Tablični računalnik (Ipad)
Plastične kapalke

Kemikalija	Piktogram
<i>Priprava metanolne raztopine DPPH• prostih radikalov</i>	
Metanol	
DPPH	
Destilirana voda	/

VARNOST PRI EKSPERIMENTALNEM DELU

Pri eksperimentalnem delu so obvezna zaščitna halja, očala. Pred začetkom je potrebno skrbno prebrati navodila za varno delo s kemikalijami na steklenicah ali plastenkah oziroma med delom upoštevati oznake za nevarne snovi.

POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA

1. Priprava metanolne raztopine DPPH• prostih radikalov

1. V 25 mL merilno bučko zatehtajte 6,90 mg DPPH.
2. V bučko do polovice dolijte pripravljeno topilo metanola in destilirane vode v razmerju 1:1. Bučko zaprite z zamaškom, ki ga dobro oblepite s parafilmskim trakom.
3. Bučko postavite v ultrazvočno kopel in kristale DPPH v njej pri temperaturi 22 °C raztapljajte 30 minut.
4. Ko so vsi DPPH kristali raztopljeni, v bučko do oznake 25 mL dolijte prej pripravljeno topilo (zmes metanola in destilirane vode).
5. Raztopino še enkrat dobro premešajte z obračanjem bučke.
6. Bučko popolnoma zavijte v aluminijasto folijo. S tem preprečite fotolitski razpad DPPH.
7. Bučko s pripravljeno raztopino hranite v hladilniku pri temperaturi med 4 in 7 °C.

2. Spektrometrično določanje absorbance raztopine DPPH ob dodatku izvlečkov poprov

1. Iz 25 mL merilne bučke v kateri imate pripravljeno metanolno raztopino DPPH• radikalov, v drugo 25 mL bučko odmerite 5 mL te pripravljene raztopine.
2. Raztopino v bučki do oznake razredčite s pripravljenim topilom, kjer sta metanol in voda v razmerju 1:1.
3. Bučko 15 minut segrevajte v vodni kopeli s temperaturo 50 °C. Po segrevanju počakajte, da se raztopina v bučki ohladi na sobno temperaturo.
4. Pripravite štiri epice in jih napolnite s pripravljeno raztopino.
5. Epice nasprotujoče si vstavite v centrifugo. Raztopine v epicah pri temperaturi 22 °C, na 6600 obratih centrifugirajte 3 minute.
6. V druge štiri epice prelijte pripravljene raztopine: v eno epico raztopino standardnega piperina, v drugo epico raztopino izolata plodov črnega popra, v tretjo epico raztopino izolata plodov zelenega popra in v četrto epico raztopino izolata plodov belega popra.
7. Epice nasprotujoče si vstavite v centrifugo. Raztopine v epicah pri temperaturi 22 °C, na 6600 obratih centrifugirajte 3 minute.
8. Pripravite pet kivete. V vsako kiveto s kapalko odmerite 3 mL pripravljene raztopine DPPH.
9. Prva kiveta je slepi vzorec z raztopino DPPH.
10. Z mikropipeto v drugo kiveto dodajte še 40 µL pripravljene raztopine standardnega piperina. Kiveto vstavite v spektrometer, ki ga z aluminijasto folijo pokrijte. S tem preprečite dostop svetlobe, ki bi povzročala fotolitski razpad snovi. Meritve absorbance homogene zmesi v kiveti s spektrometrom izvajajte 30 minut. Podatki meritev se zbirajo v preglednici tabličnega računalnika.
11. Postopek opisan pod točko 10 ponovite še za raztopino izolata plodov črnega (kiveta 3), zelenega (kiveta 4) in belega popra (kiveta 5).
12. Iz zbranih meritev v preglednicah in narisane grafa absorbance različnih raztopin v odvisnosti od valovnih dolžin preučite katera raztopina (*standardni piperin, črni, zeleni ali beli poper*) ima na DPPH• največjo antioksidativno sposobnost.

Kolorimetrična določitev antioksidacijske sposobnosti piperina na raztopino DPPH

Razbarvanje raztopine DPPH je indikator antioksidacijske sposobnosti. Raztopina DPPH ob nevtralizaciji (antioksidacijskem delovanju piperina) postopoma spreminja barvo iz vijolične v rumeno. Leva kiveta prikazuje raztopino DPPH brez dodatka izvlečka piperina. Od leve proti desni je bil v kivete dodan izvleček piperina, zato se je posledično spremenila tudi barva raztopine (slika 3). Bolj desno je kiveta, večja je koncentracija antioksidanta.

Slika 3: rezultati razbarvanja raztopine DPPH ob dodatku antioksidanta.



DPPH metoda za merjenje antioksidativne sposobnosti

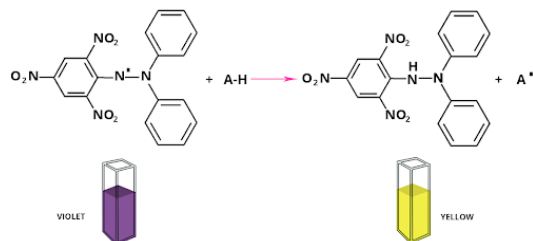
DPPH metoda velja za enostavno, hitro in poceni metodo, s katero določamo antioksidativni potencial posameznih spojin. Pogosto se uporablja za ocenjevanje lastnosti rastlinskih sestavin za ovrednotenje prostih radikalov. Metoda temelji na reakciji med stabilnim prostim radikalom DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) in donorjem vodika (antioksidanti npr. vitamini), zaradi česar se zmanjša absorbanca vzorca. Proces poteka pri sobni temperaturi v polarnem organskem topilu (npr. metanol, etanol). Pri tej metodi pride do spremembe koncentracije DPPH, kar je posledica reakcije z antioksidantom, pri tem pa je potrebno upoštevati različne pogoje, kot so reakcijski čas, topila, pH in različne spojine, ki se uporabljajo kot antioksidativni standardi. Pri redukciji pride še do spremembe barve, pri čemer se vijolično obarvana raztopina pretvori v blede rumeno barvo. Reakcija se zaključi po približno 15-30 minutah, spremembo koncentracije DPPH radikalov pa določimo s merjenjem absorbanca s pomočjo spektrometra. Meritev izvedemo pri valovni dolžini 517 nm. Rezultat se po navadi poda z EC_{50} , ki predstavlja koncentracijo antioksidanta, ki ga potrebujemo za odstranitev 50 % DPPH radikalov. Paziti moramo, da raztopino DPPH hranimo v temnem okolju, da ne pride do fotokemičnega razpada zaradi svetlobe.

Spektrometrična metoda

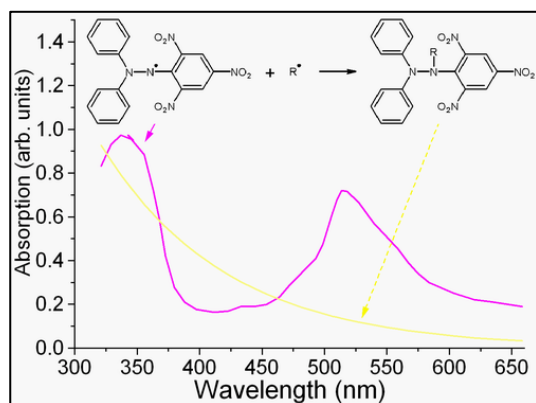
S pomočjo spektrometra se meri absorbanca raztopin v kivetah. Te morajo biti iz materiala, ki prepušča sevanje željene valovne dolžine in je inerten za merjenje raztopin. To merjenje ni zahtevno. Za analizo si izberemo valovno dolžino pri kateri je absorbanca maksimalna in jo odčitamo iz grafa. Pomembno je, da je spektrometer umerjen, To pomeni, da nastavimo absorbanco referenčnega vzorca na 0. Ko vzorce vstavljamo v spektrometer moramo biti pozorni, da ne umažemo kivete, saj nam da taka meritev napačne rezultate.

VPRAŠANJA ZA DODATNA ZNANJA

1. Pojasnite reakcijsko shemo, ki prikazuje reakcijo nevtralizacije DPPH• radikala.



2. Pojasni graf meritev absorbance v odvisnosti od valovnih dolžin.



3. Prikazan je graf meritev absorbance v odvisnosti od valovnih dolžin. Na podlagi barv krivulj pojasnite, katera vrsta plodov črnega poprovca (*Piper nigrum* L.) ima pri radikalski reakciji z DPPH• radikali največjo antioksidativno sposobnost.

Legenda:

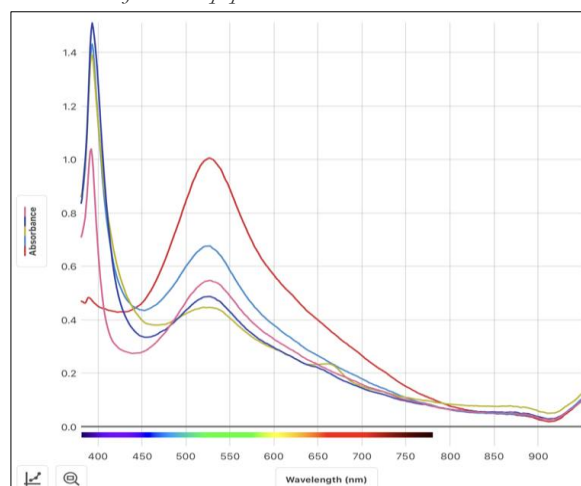
Rdeča krivulja = DPPH

Svetlo modra krivulja = zeleni poper

Roza krivulja = standard piperina

Temno modra krivulja = črni poper

Zelena krivulja = beli poper



LITERATURA

- Abazović, M. (2015). O pravilni in varni uporabi zdravil. Zdravila in neželeni učinki. 11. Dan slovenskih lekarn. Slovensko farmacevtsko društvo. Ljubljana.
- Ahmad, N., Fazal, H., Abbasi, B. H., Farooq, S., Ali, M. in Khan, M. A. (2015). Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), 1945-1953.
- Arslan, Ü., Ilhan, K. in Karabulut, Ö. A. (2009). Antifungal activity of aqueous extracts of spices against bean rust (*Uromyces appendiculatus*). *Allelopathy Journal*, 24(1), 207-214.
- Bhat, S. V., Nagasampagi, B. A. in Sivakumar, M. (2005). Chemistry of natural products. Narosa Publishing House. New Delhi.
- Chaudhry, N. M. A. in Tariq, P. (2003). Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(3), 214-218.
- Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber, S. L., Duke, J. A. in Brielmann, H. L. (2006). Natural Products from Plants. Second Editions. Taylor & Francis Group. New York.
- Firn, R. (2010). Nature's Chemicals, The natural products that shaped our world. Oxford University Press. New York.
- Grošelj, U., Kranjc, K. in Požgan, F. (2019). Biološko pomembne spojine: univerzitetni učbenik. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
- Hanson, J. R. (2003). Natural Products: The secondary metabolites. Tutorial chemistry texts. Royal Society of Chemistry UK, Ltd, London.
- Kumar, S., Singhal, V., Roshan, R., Sharma, A., Rembhotkar, G. W. in Ghosh, B. (2007). Piperine inhibits TNF- α induced adhesion of neutrophils to endothelial monolayer through suppression of NF- κ B and I κ B kinase activation. *European Journal of Pharmacology*, 575(3), 177-186.
- Kurniawan, Y. S., Priyanga, K. T. A., Krisbiantoro, P. A. in Imawan, A. C. (2021). Green chemistry influences in organic synthesis: a review. *Journal of Multidisciplinary Applied Natural Science*, 1(1) 1-12.
- Nirala, S. K., Bhadauria, M., Mathur, R. in Mathur, A. (2008). Influence of alpha-tocopherol, propolis and piperine on therapeutic potential of tiferon against beryllium induced toxic manifestations. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 28(1), 44-54.
- Pathak, N. in Khandelwal, S. (2007). Role of oxidative stress and apoptosis in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice. *Toxicology Letters*, 169(2), 95-108.
- Prijatelj, N. (2005). Farmakognozija, Kemijska struktura naravnih spojin. Učbenik. DZS.
- Reilly, C. H. in sod. (2005). The Review of Natural Products. The most complete source of natural product information. 4th Edition. Facts & Comparisons a Wolters Kluwer business.
- Scott, I. M., Jensen, H. R., Philogene, B. J. in Arnason, J. T. (2008). A review of *Piper* spp. (Piperaceae). Phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 65-75.
- Sequin, M. (2017). The chemistry of plants and insects. Plants, bugs and molecules. Royal Society of Chemistry UK, Ltd, London.
- Siddiqui, Z. S. (2007). Allelopathic effects of black pepper leaching on *Vigna mungo* (L.) Hepper. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(4), 303-308.
- Singh, A. in Duggal, S. (2009). Piperine - Review of Advances in Pharmacology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 2(3), 615-620.
- Slapničar, M. in Boh Podgornik, B. (2021). Naravne spojine v živih sistemih, Teoretične osnove z navodili za laboratorijske vaje: univerzitetni učbenik. Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta.
- Sunila, E. S. in Kuttan, G. (2004). Immunomodulatory and Antitumor activity of *Piper longum* Linn. and Piperine. *Journal of Ethnopharmacology*, 90(2), 339-346.