

KVANTITATIVNA ANALIZA PROANTOCIJANIDOLA U LIPOZOMSKIM DISPERZIJAMA

Lidija B. Petrović i Branislav S. Pekić

Lipozomi se, zbog svojih izuzetnih osobina, poslednjih godina sve više koriste u medicini, farmaciji i kozmetici, kao nosači aktivnih principa. Biljni ekstrakti koji sadrže flavonoide pobuđuju sve veće interesovanje jer poseduju širok spektar farmakološkog delovanja. Od posebnog značaja je grupa jedinjenja obuhvaćena nazivom proantocijanidoli, proizvodi polimerizacije flavan-3-ola do oligomera.

U radu je razrađena spektrofotometrijska metoda za kvantitativno određivanje proantocijanidola u lipozomskim disperzijama, pri čemu je kao bojeni reagens korišćen vanilin. Pokazano je da se ova metoda odlikuje visokom reproduktivnošću i pouzdanošću određivanja.

KLJUČNE REČI: *proantocijanidoli, lipozomi, spektrofotometrijsko određivanje*

UVOD

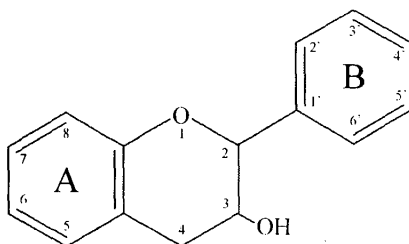
Lipozomi se, poslednjih godina, uspešno koriste kao nosači antibiotika, antimikotika, glukokortikoida, citostatika i drugih farmakološki aktivnih supstanci (1,2). Veoma je raširena njihova primena u kozmetičkim preparatima (3) kao vlažećih agenasa („prazni” lipozomi) ili kao nosača aktivnih principa (vitamina, peptida, biljnih ekstrakata, UV filtera itd.).

Biljni ekstrakti koji sadrže flavonoide pobuđuju sve veće interesovanje jer poseduju širok spektar farmakološkog delovanja. Posebno je značajna grupa jedinjenja obuhvaćena nazivom proantocijanidoli, kojima se pripisuje svojstvo hvatača slobodnih radikala (4,5), kardio-protektivno (6) i antikancerogeno (7) delovanje, kao i dobra biološka raspoloživost (8).

Proantocijanidoli su proizvodi polimerizacije flavan-3-ola (sl. 1) do oligomera. Prema tome, to su jedinjenja koja spadaju u grupu flavanola, čiji osnovni skelet čine dva benzenova prstena (A i B) i jedan heterociklični prsten koji je oksidovan. Supstitucijom vodonikovih atoma benzenovih prstenova hidroksilnim funkcionalnim grupama nastaju čitave serije različitih jedinjenja. U biljkama umerenog klimata nalaze se, uglavnom, derivati flavan-3-ola čiji je prsten A hidroksilovan u položajima 5 i 7. U zavisnosti od broja i rasporeda hidroksilnih funkcija na prstenu B, postoje tri serije: afzelenska (4'), katehinska (3' i 4') i galokatehinska (3', 4' i 5'). Jedinjenja katehinske serije su najrasprostranjenija u biljnom svetu i imaju

Mr Lidija B. Petrović, asistent, Dr Branislav S. Pekić, red.prof., Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 21000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1, Jugoslavija.

poseban farmakološki značaj. Pošto su kod katehina C-2 i C-3 atomi asimetrični, moguća su četiri stereoizomera, a njihovom polimerizacijom uspostavljanjem C-C veze između C-4 atoma jednog i C-8 ili C-6 atoma drugog molekula, nastaju dimeri i trimeri.



Slika 1. Strukturna formula flavan-3-ola

Navedeni monomeri, dimeri i trimeri katehinske serije proantocijanidoli, poslednjih godina se često određuju u grožđu i vinu (913) jer se upravo njima pripisuju farmakološka svojstva. Inkorporiranjem proantocijanidola u liposome i njihovom ugradnjom u različite oblike za lokalnu primenu, omogućena je bolja penetracija i duže zadržavanje na koži, a samim tim i pozitivan efekat na očuvanje njene elastičnosti i vlažnosti. U radu je razrađena spektrofotometrijska metoda za određivanje proantocijanidola grožđa i vina u lipozomskim disperzijama.

EKSPERIMENTALNI DEO

Materijal

U ispitivanjima u okviru ovog rada korišćeni su proantocijanidoli (PRO-BP1) dobijeni ekstrakcijom iz semenki grožđa prema patentom zaštićenom postupku (14). Kao standardna supstanca proantocijanidola (PRO-S) korišćen je PRO-BP1 koji je prečišćen iz alkoholno vodenog rastvora aktivnim ugljem i liofilno osušen, a kao standard monomera katehinske serije (+)-katehinhidrat, Fluka.

Ispitivane 10% lipozomske disperzije sa proantocijanidolima dobijene su od fosfolipida soje – Phospholipon[®]-a 80, proizvođača Nattermann Phospholipid GmbH, Rhône Poulenc Rorer, Köln, prema razrađenom postupku (15).

Ostale primenjene hemikalije bile su p.a. kvaliteta.

Metode

Za izradu standardnog dijagrama korišćen je osnovni rastvor flavan-3-ola, PRO-S, (0,2 mg/cm³) u metanolu, od kojeg su razblaživanjem napravljeni rastvori u opsegu koncentracija od 0,04 do 0,2 mg/cm³. Na isti način pripremljeni su i rastvori ispitivanih lipozomskih disperzija sa proantocijanidolima. Lipozomske disperzije "praznih" lipozoma (bez aktivne komponente) rastvarane su u metanolu u opsegu koncentracija od 10 do 80 mg/cm³. Metanolni rastvori ispitivanih uzoraka mešani su sa bojenim reagensom u odnosu

1:4 (v/v). Neposredno nakon homogenizovanja mučkanjem izmerena je apsorbancija na talasnoj dužini $\lambda=510$ nm, čija vrednost ostaje nepromenjena u toku sat vremena. Kao slepa proba korišćena je smeša metanola i bojenog reagensa u odnosu 1:4 (v/v).

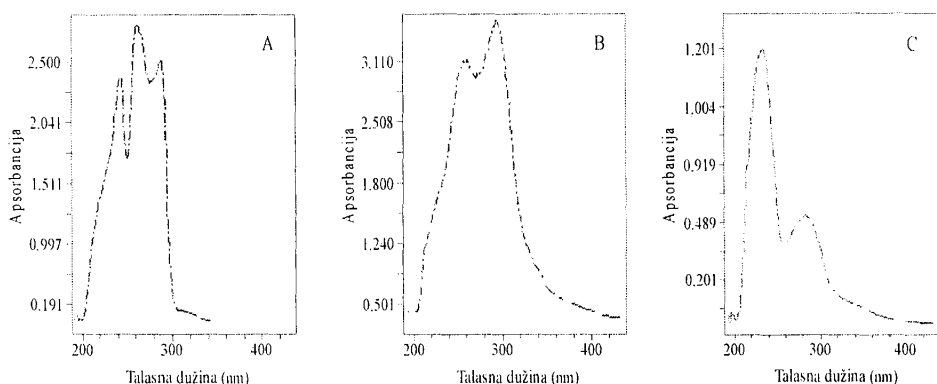
Bojeni reagens vanilina napravljen je mešanjem 30% (v/v) sumporne kiseline u metanolu i 1% (m/v) vanilina u metanolu u odnosu 1:1 (v/v).

Sva merenja vršena su na UV-VIS spektrofotometru SP-500, Series 2, PYE UNICAM. Greška instrumenta iznosi $\pm 0,1\%$ T.

Apsorpcioni spektri (+)-katehina, proantocijanidola i Phospholipon[®]-a 80 snimljeni su na A Diode Array spektrofotometru HEWLETT PACKARD 8452.

REZULTATI I DISKUSIJA

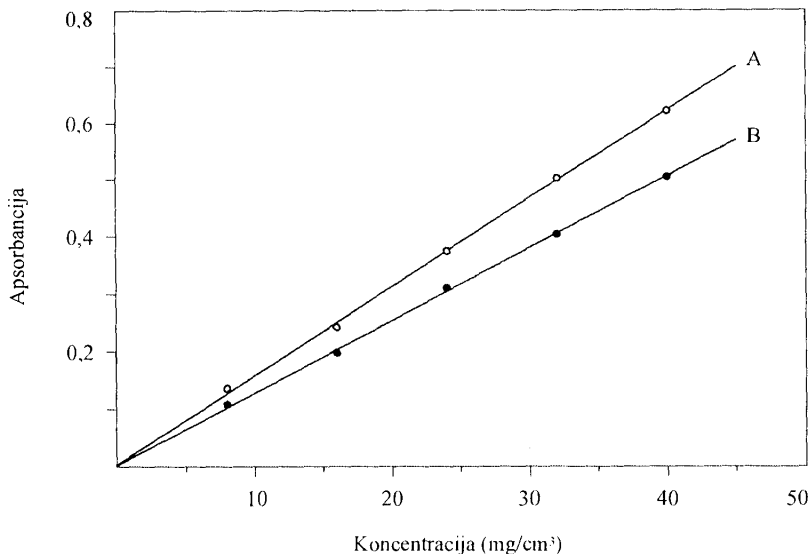
Opšte je poznato da flavonoidi i flavanoidi imaju maksimum apsorbancije u UV oblasti. Naša ispitivanja UV apsorbancije metanolnog rastvora (+)-katehina i proantocijanidola (sl. 2) su pokazala da oni imaju maksimum apsorbancije u istom intervalu talasnih dužina (od 260 do 290 nm) kao i Phospholipon[®] 80. Ova činjenica isključuje mogućnost primene UV spektrofotometrije za određivanje (+)-katehina i proantocijanidola inkorporiranih u liposome.



Slika 2. UV-spektri (+)-katehina (A), proantocijanidola (B) i Phospholipon[®]-a 80 (C)

Druga mogućnost za spektrofotometrijsko određivanje proantocijanidola je primena karakteristične bojene reakcije. Reakcijom kondenzacije vanilina i derivata flavan-3-ola u kiseloj sredini nastaje stabilno crveno obojenje, koje se koristi za njihovo fotometrijsko određivanje (13). Vanilin sa izvesnim flavonoidima (halkoni, flavonoli, flavononi) ne daje bojenu reakciju, te se smatra da je ona specifična za flavanole (16).

U nastavku rada ispitivali smo mogućnost primene bojene reakcije sa vanilinom za spektrofotometrijsko određivanje proantocijanidola u lipozomskim disperzijama. Nadenno je da se za zavisnost apsorbancije od koncentracije (+)-katehina pokorava Lambert-Beer-ovom zakonu u intervalu koncentracija od 8 do 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (sl. 3A). Ova linearna zavisnost ($r=0,9997$) izražena je empirijskom jednačinom $y = 0,00267 + 0,0155 x$.



Slika 3. Dijagrami zavisnosti apsorbancije od koncentracija (+)-katehina (A) i proantocijanidola (B)

Određivanjem sadržaja proantocijanidola u uzorku PRO-BP1 korišćenjem bojene reakcije sa vanilinom i standardnog dijagrama izrađenog sa (+)-katehinom (sl. 3A) nađeno je da je njihov sadržaj 81%. Imajući u vidu činjenicu da kondenzovani flavan-3-oli (proantocijanidoli) daju manji intenzitet obojenja u poređenju sa monomerom i da on opada sa porastom stepena polimerizacije (16), očigledno je da uzorak PRO-BP1 sadrži znatno veći procentualni udeo čistih proantocijanidola. Prečišćavanjem uzorka PRO-BP1 aktivnim ugljem sadržaj čistih proantocijanidola, računato na (+)-katehin, porastao je za 1,1%. Iz ovih razloga izradili smo standardni dijagram koristeći uzorak standarda proantocijanidola PRO-S (sl. 3B). Kao i u slučaju (+)-katehina postoji linearna zavisnost ($r = 0,9996$) koja se može izraziti empirijskom jednačinom $y = 0,00405 + 0,01249 x$.

U nama dostupnoj literaturi opisana su spektrofotometrijska određivanja proantocijanidola izolovanih iz zelenog čaja (16) kao i proantocijanidola grožđa i vina u rastvoru (13). Imajući u vidu da se u slučaju lipozomskih disperzija, kao "nosača" proantocijanidola, radi o koloidnim sistemima koji imaju određene optičke osobine, ispitali smo mogućnost primene ove metode. Ustanovljeno je da metanolni rastvori praznih lipozoma ne opalesciraju (nema vidljivog rasipanja svetla), kao i da u smeši sa bojenim reagensom ne apsorbuju svetlost na ispitivanoj talasnoj dužini (nema odziva u odnosu na slepu probu). Ovo ukazuje na mogućnost primene spektrofotometrijske metode sa bojenim reagensom vanilina za određivanje proantocijanidola u ispitivanim lipozomskim disperzijama.

Sa ciljem provere pouzdanosti određivanja proantocijanidola u lipozomskim disperzijama, određivan je njihov sadržaj u lipozomskoj disperziji sa poznatim sadržajem aktivne supstance (1%). Upoređujući dobijene vrednosti apsorbancije za različite koncentracije proantocijanidola sa apsorbancijama dobijenim za proantocijanidole inkorporirane u liposome (tab. 1), vidi se da postoji minimalno odstupanje koje je unutar eksperimentalne greške. To ukazuje na visoku pouzdanost odabrane metode.

Tabela 1. Rezultati merenja apsorbancije proantocijanidola slobodnih i inkorporiranih u liposome u odnosu 1:10

Konc. PRO ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	8	16	24	32	40
A_{PRO}	0,110	0,199	0,310	0,402	0,502
$A_{\text{PRO} + \text{lipozom}}$	0,107	0,200	0,302	0,390	0,502
Rel. greška (%)	2,727	0,503	2,581	2,985	0
Sr. vr. rel. greške (%)	1,7592				

Radi ispitivanja reproduktivnosti određivanja proantocijanidola u lipozomskim disperzijama odredivan je više puta njihov sadržaj u istim uzorcima. Dobijeni rezultati (tab. 2) ukazuju da spektrofotometrijska metoda, primenom vanilina kao bojenog reagensa, obezbeđuje visok stepen reproduktivnosti rezultata.

Tabela 2. Rezultati ispitivanja reproduktivnosti spektrofotometrijske metode određivanja proantocijanidola u lipozomskim disperzijama sa 0,5 i 1% PRO-BP1

Red. br. određivanja	Sadržaj PRO u lipozomskoj disperziji (%)	
	0,5	1
1	0,472	0,981
2	0,475	0,975
3	0,478	0,978
4	0,477	0,982
5	0,480	0,982
6	0,478	0,980
7	0,475	0,979
Srednja vrednost	0,4764	0,9769
Koeficijent varijacije (%)	0,5535	0,2559

ZAKLJUČAK

Ispitivanja su pokazala da fosfolipidi imaju maksimum apsorbancije u istom intervalu talasnih dužina kao i proantocijanidoli, što isključuje mogućnost primene UV-spektrofotometrije za njihovo određivanje. Nađeno je da je za određivanje proantocijanidola u lipozomskim disperzijama pogodna spektrofotometrijska metoda, pri čemu se kao bojeni reagens koristi vanilin. Statistička obrada dobijenih rezultata pokazala je visoku reproduktivnost i pouzdanost ove metode.

LITERATURA

1. Mezei, M. and V. Gulasekharan: Liposomes – A selective drug delivery system for the topical route of administration, Gel dosage form. *J.Pharm.Pharmacol.* **34** (1982), 473–474.
2. Ganesan, M.G., Weiner, N.D., Flynn, G.L. and N.F.H. Ho: Influence of liposomal drug entrapment on percutaneous absorption. *Int.J.Pharm.* **20** (1984), 139–154.
3. Junginger, H.E., Hofland, E.J. and J.A. Bouvstra: Liposomes and Niosomes: Interaction with human skin. *Cosmet. & Toil.* **106** (1991), 45–50.
4. Masquelier, J.: Vins et radicaux libres. *Diet.Méd.* **14** (1987), 141–145.
5. Zao, B., Li, X., He, R., Cheng, S. and X. Wenhuan: Scavenging effect of extract of green tea and natural antioxydants on active oxygen radicals. *Cell.Biophys.* **14** (1989), 175–185.
6. Bogdanović, G., Vučković, D., Velimirović, S., Milošević, M., Baltić, V., Kovačević, Z. and B. Pekić: Contribution to research on the protective effect of proanthocyanidol BP-1 on andriamicine-induced cardiotoxicity. *Acta Vet.* **46** (1996), 317–326.
7. Okuda, T.: Natural polyphenols as antioxydants and their potential use in cancer prevention. In *Polyphenolic Phenomena*. Eds. A. Scalbert, INFRA Editions, Paris 1993, pp. 221–235.
8. Leparra, J., Michaud, J. and J. Masquelier: Etude pharmacocinétique des oligomères flavonoliques. *Plant. Médic. Phytotér.* **11** (1997), 133–142.
9. Kovač, V. i B. Pekić: Proantocijanidoli grožđa i vina. *Sav.Polj.* **39** (1991), 5–17.
10. Ricardo de Silva, J.M., Darmon, N., Fernandez, Y. and S. Matjavila: Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seed. *J.Agric.Food Chem.* **39** (1991), 1549–1552.
11. Boukharta, M.: Etude des catéchines et procyanidines des pépins, des sarments et de fenilles de vigne, These, Université de Lorraine, Nancy, 1988.
12. Kovač, V., Bourzeix, M., Heredia, N. and T. Ramos: Etude des catéchines et proanthocyanidols de raisin vins blancs. *Rev.Fr.D'Oenologie* **125** (1990), 7–14.
13. Pekić, B., Kovač, V., Alonso, E. and E. Revilla: Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. *Food Chem.* **61** (1998), 201–206.
14. Pekić, B. i V. Kovač: YU Patent P-205/93 (1993).
15. Petrović, L.: Dobijanje, karakterizacija i stabilnost liposoma sa proantocijanidolima, Magistarska teza, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu (1998).
16. Goldstein, J.L. and T. Swain: Changes in determining of degree of polymerisation of flavans. *Nature* **198** (1963), 588–589.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF PROANTHOCYANIDOLS IN LIPOSOMAL DISPERSIONS

Lidija B. Petrović, Branislav S. Pekić

In the recent years, because of their exceptional characteristics liposomes are more and more used in medicine, pharmacy and cosmetics as a carrier of active principles. Because of their wide spectrum of pharmacological action, plant extract containing flavonoides attract increasing attention. In that regard proanthocyanidols – polymerization products of flavan-3-ols, which are oligomers in fact, are of a great importance.

In this work a spectrophotometric method has been developed for determination of proanthocyanidols in liposomal dispersions, using vanillin as coloring agent. It has been shown that this method is highly reliable and reproducible.

Prispeo 28. januara 2000.
Prihvaćen 4. septembra 2000.